

Zur Frage der Einheitlichkeit
der sogenannten kleinen Rattenlymphocyten

Christine Lücke-Huhle
München 1967



AUS DEM MAX - PLANCK - INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr.A. BUTENANDT

ZUR FRAGE DER EINHEITLICHKEIT
DER SOGENANNTEN KLEINEN RATTENLYMPHOCYTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Lücke-Huhle
aus Chemnitz

München 1967

Mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr.Dr.A. Butenandt
Korreferent: Professor Dr.H.Autrum
Dekan: Professor Dr.H.Autrum

Tag der Promotion: 15.November 1967

Ich danke Herrn Professor Dr.A. BUTENANDT
und Herrn Professor Dr.G. RUHENSTROTH-BAUER
für die gestellte Aufgabe und die großzügige
Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung	1
II. Methoden	3
1. Die Zellelektrophorese	3
a) Wesen der Zellelektrophorese	3
b) Das verwendete Zellelektrophoresesystem ..	3
c) Versuchsbedingungen und Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit	5
2. Präparation der verschiedenen Zellsuspensionen für elektrophoretische Messungen	7
a) Leukocyten aus Rattenblut	7
b) Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus	9
c) Milzzellsuspension	9
d) Lymphocyten suspension aus Lymphknoten oder Thymus	9
e) Knochenmarkzellen	9
3. Ductusdrainage zur Gewinnung einer reinen Lympho- cytensuspension	10
a) Das Lymphgefäßsystem der Ratte	10
b) Methodik der Drainage	10
4. Der Impulshöhenanalysator nach GUTMANN	12
a) Arbeitsweise des Gerätes	12
b) Berechnung des Zellvolumens	13
5. Markierungsversuche an Rattenlymphocyten	13
a) Material	13
b) Gewinnung der elektrophoretisch langsa- men Lymphocyten suspension (Typ A)	13
c) Gewinnung der elektrophoretisch schnel- len Lymphocyten suspension (Typ B)	14
d) Gewinnung eines Gemisches aus Typ A und Typ B	14
e) Radioaktive ^3H -Markierung der Lympho- cyten mit ^3H -Adenosin	14
f) Injektion der Lymphocyten suspension	15
g) Autoradiographie	15
6. Agglutinationstest zur Bestimmung der Serumanti- körper bei der Maus	16
7. Plaque-Test nach JERNE zum Nachweis Antikörper- bildender Zellen	16

	Seite
8. Bestimmung der Überlebensrate von Zellen mithilfe des Trypanblau-Testes	17
9. Durchführung von Röntgenbestrahlungen	18
III. E r g e b n i s s e	18
A) Versuche zur Identifizierung einer Fraktion elektrophoretisch schnell beweglicher Leuko- cyten, die nach bestimmten Reizen im Blut auf- treten	18
1. Das Hämocytogramm der normalen Ratte	18
2. Das Auftreten der schnellen kernhaltigen Zellfraktion im Hämocytogramm der Ratte....	20
a) nach Röntgenganzkörperbestrahlung	20
b) nach Alkoholinjektion	20
3. Auswirkung der Alkoholinjektion auf das periphe- re Blutbild der Ratte	23
4. Zellelektrophoretische Untersuchung von Lympho- cyten aus dem Ductus thoracicus	25
5. Wirkung einer Röntgenganzkörperbestrahlung auf die Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus	28
6. Auswirkung einer Unterbindung des Ductus thoraci- cus auf die Lebenserwartung, das Hämocytophero- gramm und das Blutbild der Ratte	30
7. Zellelektrophoretische Untersuchungen an lymph- atischen Organen	32
a) Milz	32
b) Lymphknoten	32
c) Thymus	34
d) Knochenmark	34
8. Einfluß der Milz auf das Auftreten von elektro- phoretisch schnellen Leukocyten	34
B) Unterteilung der morphologisch "kleinen" Lympho- cyten nach ihrem Volumen und ihrer Funktion	38
1. Volumenmessung an Rattenlymphocyten mittels des Impulshöhenanalysators nach GUTMANN	38
a) Messungen an Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus	38
b) Messungen an Rattenblut-Leukocyten	44

	Seite
2. Inkubation von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus der normalen Ratte in homolo- gem Rattenplasma	45
3. Markierungsversuche an Rattenlymphocyten	47
4. Zellelektrophoretische Untersuchungen bei der Immunisierung von Mäusen	57
5. Untersuchung der einzelnen Lymphocytenfraktio- nen auf ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung mithilfe des Plaque-Testes nach JERNE	52
IV. B e s p r e c h u n g	54
V. Z u s a m m e n f a s s u n g	66
VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	69

I. Einleitung

Untersuchungen der letzten Jahre haben die große Bedeutung der Lymphocyten für immunologische Probleme ergeben. Eine Schwierigkeit bei Experimenten mit diesen Zellen ist jedoch ihre große Empfindlichkeit gegenüber mechanischen und chemischen Isolierungsmethoden, so daß es notwendig ist, möglichst schonende Untersuchungsverfahren zu wählen.

Die Anwendung der Zellelektrophorese, die eine Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit erlaubt, stellte deshalb eine wertvolle methodische Bereicherung auf dem Gebiet der Blutzellenforschung dar. Jede Blutzellenart besitzt eine für sie charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit, die im Hämoctytopherogramm graphisch dargestellt werden kann. Hier haben beim Menschen die Granulocyten mit $0,626 \pm 0,030 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ die geringste elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit, dann kommen die Lymphocyten ($b = 0,794 \pm 0,020 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$) und am schnellsten bewegen sich die Erythrocyten ($b = 1,015 \pm 0,021 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$).

Bei verschiedenen Krankheiten ändert sich jedoch das Bild (RUHENSTROTH - BAUER et al., 1961; Übersicht: RUEFF, 1964). So fehlten in 30 untersuchten Fällen von myeloischer Leukämie die Werte der normalen Granulocyten fast völlig; statt dessen trat eine neue Population kernhaltiger Zellen mit einer weit größeren elektrophoretischen Beweglichkeit auf. Erythrocyten und Lymphocyten waren bei diesen Patienten unverändert. Analoge Abweichungen zeigten die Hämoctytopherogramme von Patienten mit lymphatischer Leukämie; nur ersetzte hier die neue, elektrophoretisch schnelle Fraktion die normalbeweglichen Lymphocyten, während Erythrocyten und Granulocyten unverändert blieben. Bei einer Anzahl von Krankheiten, insbesondere solchen, die mit einer akuten Entzündung einhergehen, fand sich außer den elektrophoretisch normalen Blutzellfraktionen eine dritte kernhaltige Zellgruppe, die ungefähr die Wanderungsgeschwindigkeit der Erythrocyten aufwies.

Optisch können bei der elektrophoretischen Messung die kernhaltigen Leukocyten sehr gut von den kernlosen Erythrocyten unterschieden werden, eine sichere morphologische Differenzierung der Leukocyten in ihre Untergruppen ist aber nicht möglich. So konnte

den Granulocyten und den Lymphocyten des Normalblutes bisher nur durch die Messung von Leukämieblut, bei dem eine normale Leukocytenfraktion völlig fehlt, ihre elektrophoretische Beweglichkeit zugeordnet werden; auch die neuauftretende elektrophoretisch schnelle Zellgruppe konnte in der Zellelektrophoreseapparatur nicht sicher identifiziert werden.

Da die nach PAPPENHEIM gefärbten Blutaussstriche bei akuten Entzündungen morphologisch keinen neuen Zelltyp erkennen ließen, stellte sich die Frage, ob die elektrophoretisch schnellen Zellen zu den Granulocyten oder zu den Lymphocyten gehören.

Bei der Ratte steigt 3 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R die Fraktion der schnellen Leukocyten auf 50-60 %, gegenüber 5 % im normalen Hämoctophrogramm, an (ARNOLD, 1964). Da aber zu dieser Zeit in der Zellelektrophoreseapparatur kaum Werte für Granulocyten gemessen werden konnten, in gefärbten Blutaussstrichen von Tieren aus der gleichen Versuchsreihe jedoch morphologisch normale Granulocyten gefunden worden waren, nahm ARNOLD an, daß es sich bei der schnellen Zellfraktion um "membranunreife" Granulocyten handeln könnte. Die myeloischen Knochenmarksvorstufen besitzen nämlich die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die fragliche Zellgruppe.

Die ARNOLD sche Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend geprüft und hat sich dabei als irrig erwiesen. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei der schnell beweglichen Leukocytenfraktion um Lymphocyten handelt, so daß der zweite Teil der Arbeit dann ausschließlich dieser Untergruppe der Leukocyten gewidmet ist.

Die Lymphocyten waren schon lange bekannt, aber erst RUDOLF VIRCHOW (1851) wies auf ihre Bedeutung hin. Er schrieb diesen Zellen, die bis dahin allgemein als inaktiv und funktionslos betrachtet worden waren und trotz ihrer großen Verbreitung in Blut und Lymphsystem wenig beachtet wurden, erstmalig eine Funktion in der Abwehrreaktion des Körpers zu. Seit dieser Zeit haben viele Gruppen daran gearbeitet, das Wissen um Herkunft, Funktion und Lebensweg dieser Zellen zu erweitern. Heute besteht kein Zweifel darüber, daß es sich bei den Lymphocyten nicht um eine funktionell einheitliche Population handelt. Auch zu diesem Problem bringt die vorliegende Arbeit einen Beitrag.

II. Methoden

1. Die Zellelektrophorese

a) Wesen der Zellelektrophorese

Alle bisher untersuchten Wirbeltierzellen, namentlich auch die Blutzellen, weisen bei einer Aufschwemmung in einer physiologischen Elektrolytlösung an ihrer Oberflächenmembran eine negative Überschußladung auf. Aus diesem Grund wandern sie in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit der negativen Überschußladung direkt proportional ist. Unter konstanten Meßbedingungen lassen sich gut reproduzierbare und vergleichbare Werte ermitteln, so daß Abweichungen von den Normalbefunden Schlüsse auf Veränderungen an der Oberflächenstruktur zulassen.

Die theoretischen Grundlagen für die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit suspendierter Zellen wurden zu Beginn dieses Jahrhunderts erarbeitet. Gestützt auf die Modellvorstellungen über die elektrochemischen Grenzflächenerscheinungen von HELMHOLTZ und GUY -CHAPMAN entwickelte STERN (1924) eine heute allgemein anerkannte Theorie über die elektrokinetischen Vorgänge. Infolge technischer Schwierigkeiten waren jedoch bis vor kurzem die Möglichkeiten für eine breitere Anwendung der Methode nur gering. Erst in letzter Zeit gelang es, die Zellelektrophoreseapparatur so weit zu vervollkommen und zu standardisieren, daß die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit von Zellen im elektrischen Feld wesentlich vereinfacht und eine gute Reproduzierbarkeit erreicht werden konnte.

b) Das verwendete Zellelektrophoresesystem

Das für die nachfolgend besprochenen Untersuchungen verwendete Cytopherometer wurde im Arbeitskreis RUHENSTROTH - BAUER aus dem PONDER'schen Modell (PONDER, 1951) entwickelt und von der Firma ZEISS, Oberkochen, gebaut. Es besteht aus einem Mikroskop, einer von einem Kühlsystem umgebenen Meßkammer und zwei Elektroden (Abb.1). Das Mikroskop erlaubt eine 400- und 800fache Vergrößerung und besitzt eine phasenoptische Einrichtung;

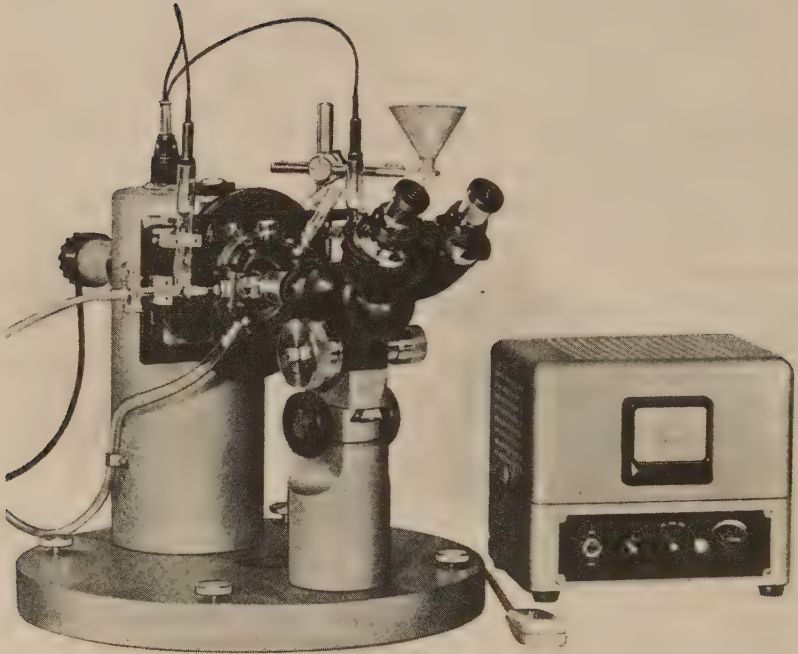


Abb.1: Gesamtansicht des Cytopherometers von ZEISS
mit Duostat (Copyright Labor Dr.Derlath)

seine optische Achse ist horizontal angeordnet, da die Meßkammer senkrecht stehen muß, um Einflüsse, die die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit verfälschen könnten, möglichst auszuschließen. Die Meßkammer ist aus Durex - 50 - Glas gefertigt und hat folgende Maße: Länge 32 mm, Höhe 14 mm, Tiefe 0,7 mm. Diese Ausmaße bedingen, daß die endosmotische Flüssigkeitsbewegung entlang der schmalen Meßkammerteile vernachlässigt werden darf (SMOLUCHOWSKI, 1921). Beiderseits der Kammer sind Elektroden angelegt. Es handelt sich dabei um Kupfer- Kupfersulfat- Elektroden. Um die Kupferionen während des Fließens des elektrischen Stromes von der Meßsuspension fern zu halten, sind eine Gipsplombe, eine Gelatineplombe und ein Zwischenstück mit einem Glasfilter und einem Membranfilter zwischengeschaltet (ARNOLD, 1964).

Alle Versuche müssen bei konstanter Temperatur durchgeführt werden, was durch einen Kühlmantel, der an einen Thermostat angeschlossen ist, gewährleistet wird.

Nur in den sog. stationären Ebenen der rektangulären Meßkammer kann die wahre elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit einer Zelle gemessen werden, ohne daß ihrer Bewegung elektroendosmotische Flüssigkeitsströmungen überlagert werden (SMOLUCHOWSKI, 1921). Für die verwendete Meßkammer lagen die stationären Ebenen, von der Vorderseite der Kammer aus gemessen, bei einer Tiefe von 143 und 540 μ . Alle Messungen wurden nur in der vorderen stationären Ebene, also bei 143 μ durchgeführt. Die Richtigkeit der errechneten Ebenen wurde mittels einer Strömungsparabel überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Werte für die elektrophoretische Beweglichkeit von Rattenerythrocyten, die in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert worden waren, für verschiedene Kammertiefen gemessen und in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt (Abb.2). Die daraus resultierende Parabel war symmetrisch, ihr Scheitelpunkt lag in der Tiefenmitte der Kammer und die Wanderungsgeschwindigkeit der Erythrocyten stimmte in den beiden stationären Ebenen überein.

c) Versuchsbedingungen und Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit

Als Suspensionsmedium wurde entweder physiologische Kochsalz-

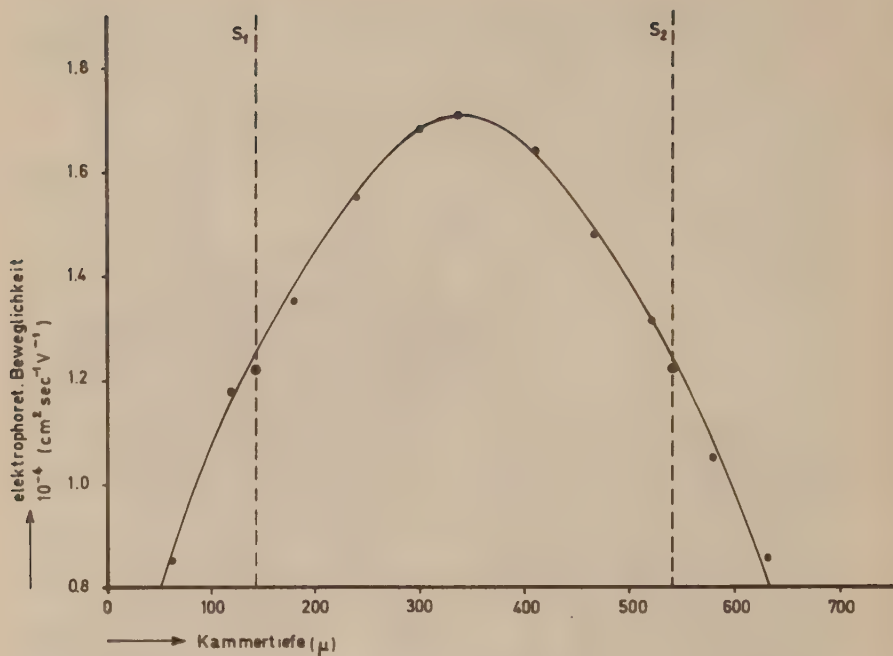


Abb. 2: Strömungsparabel der elektrophoretischen Beweglichkeit von Rattenerythrocyten in physiologischer Kochsalzlösung
 s_1 = vordere stationäre Ebene, s_2 = hintere stationäre Ebene

lösung (0,9 %) oder Blutplasma, welches mit physiologischer Kochsalzlösung 3:2 verdünnt worden war, verwendet. Der spezifische Widerstand der Medien wurde in einem Wasserbad von 23°C, welches an einem Ultrathermostaten angeschlossen war, mittels einer Wheatstonschen Brücke gemessen; er lag bei 68Ωcm. Die Stromstärke betrug bei allen Versuchen 5 mA. Die Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit (b) der Zellen erfolgte nach der Formel

$$b = \frac{1 \cdot f}{F} \cdot \eta \left[\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1} \right]$$

Hierbei ist l die Strecke (cm), die das Teilchen in der gestoppten Zeit t (sec) zurückgelegt hat. η ist die Viskosität, die hier als 1 angenommen werden kann (SACHTLEBEN, 1962). f ist ein Faktor, der für jede Meßkammer ein für allemal berechnet werden muß, da die Frontlinse des Objektivs starr mit der Meßkammer verbunden ist und sich deshalb die Brennweite und somit auch die Vergrößerung beim Fokussieren auf Vorder- und Hinterwand der Meßkammer ändert. Für die stationäre Ebene von 143μ beträgt der Faktor 0,983. F ist die Feldstärke, die sich errechnet aus

$$F = \frac{\varrho \cdot I}{h \cdot b} \left[V \text{ cm}^{-1} \right]$$

Dabei bedeutet ϱ den spezifischen Widerstand (Ω cm) des Aufschwemmungsmediums, I die Stromstärke (A) und h und b die Höhe (cm) und Tiefe (cm) der Meßkammer.

Da es sich hauptsächlich um vergleichende Messungen handelt, war es notwendig, die Versuchsbedingungen genau einzuhalten. Als Kontrolle dafür wurden bei jeder Untersuchung normale Rattenerythrocyten mitgemessen, welche Strom- oder Temperaturschwankungen durch Abweichung von ihrer normalen elektrophoretischen Beweglichkeit sofort anzeigen.

2. Präparation der verschiedenen Zellsuspensionen für elektrophoretische Messungen

a) Leukocyten aus Rattenblut

Das Blut wurde aus der Aorta abdominalis mittels einer 10 ml Glasspritze entnommen, die ca 30 E Heparin / 5 ml Blut enthielt, um die Gerinnung zu verhindern. Das abgenommene Blut wurde im Verhältnis 3:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und in Glasröhrchen, die speziell zu diesem Zweck angefertigt worden waren, bei 150 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Glasröhrchen (Abb.3a), die an einer Seite durch einen abdrehbaren Gummistopfen (Abb.3b) eines Plastikkolbens (Abb.3c) verschlossen werden, sind an der anderen Seite zu ei-

ner gekrümmten Kapillare ausgezogen. Nach der Zentrifugation ist es damit sehr einfach, das Plasma und die Leukocyten-schicht von den Erythrocyten zu trennen.

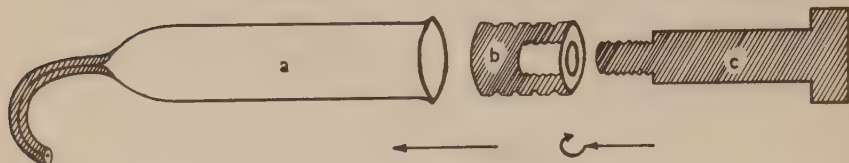


Abb.3: Präparationsgefäß für Leukocyten (nach M.PRÄTORIUS, München)

a = Glasröhrchen mit ausgezogener Kapillare

b = abdrehbare Gummistopfen eines Plastikkolbens c

c = Plastikkolben

Durch Hochschieben des Kolbens kann über die Kapillare tropfenweise dekantiert werden. Für die Füllung einer Meßkammer wurden ca 3 ml Suspension benötigt. Bei dieser Art der Präparation von Leukocyten verliert man ca 50 % der Gesamtleukocyten, da man ja darauf bedacht sein muß, die Suspension möglichst erythrocytenfrei zu bekommen. Dieser Wert von 50 % ermittelte sich aus Versuchen an 5 Tieren, bei denen die Leukocyten vor und nach der Präparation gezählt worden waren. Durch Differenzierung der Blutaussstriche dieser Tiere vor und nach der Anreicherung konnte gezeigt werden, daß der Verlust mehr die Granulocyten als die Lymphocyten betrifft. Dieser Befund zeigt neuerlich, daß man das Hämocytopherogramm eines Blutes, dessen Zellen fraktioniert wurden, nur für qualitative Aussagen heranziehen kann. Daß sich auch während der elektrophoretischen Messung die Granulocyten bevorzugt an die Kammerwand setzen, ergaben Differentialblutbilder vor und nach der Messung in der Elektrophoresekammer.

b) Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus

Die Lymphproben wurden in je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 100 E Heparin (Vetren: Fa.Promonta, Hamburg) im Laufe einer Stunde gesammelt. Die Tiere befanden sich während dieser Zeit unter Chloralhydratnarkose; das Narkotikum wurde in einer Dosis von 36 mg/ml/100 g intraperitoneal appliziert (siehe Methode 3,b). Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten lang bei 150 g zentrifugiert, einmal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und im gleichen Medium aufgeschwemmt in der Zellelektrophoreseapparatur einer Bestimmung ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit unterzogen. Von jeder Probe wurden 20 - 30 Zellen gemessen.

c) Milzsuspension

Die Milzen wurden mittels einer kleinen Presse zerquetscht, in physiologischer Kochsalzlösung oder Michaelis-Kochsalz-Puffer (pH 6,9) aufgeschwemmt, ca 10 Minuten mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend durch Mullschichten filtriert. Das Zellsediment wurde abzentrifugiert und nach erneutem Suspendieren in physiologischer Kochsalzlösung unter Standardbedingungen elektrophoretisch gemessen. Um ein Klumpen während der Aufarbeitung zu verhindern, wurde dem Puffer und der physiologischen Kochsalzlösung Heparin zugesetzt.

d) Lymphocytensuspension aus Lymphknoten oder Thymus

Die Aufbereitung dieses Materials erfolgte so wie bei den Milzen, nur wurden die Lymphknoten und Thymi vor dem Suspendieren mit einer kleinen Schere zerschnitten.

e) Knochenmarkzellen

Das Knochenmark wurde aus dem Femur der Ratte gewonnen, indem dieser mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült wurde. Anschließend wurde die Zellaufschwemmung durch Mullschichten filtriert und entsprechend verdünnt.

3. Ductusdrainage zur Gewinnung einer reinen Lymphocyten-suspension

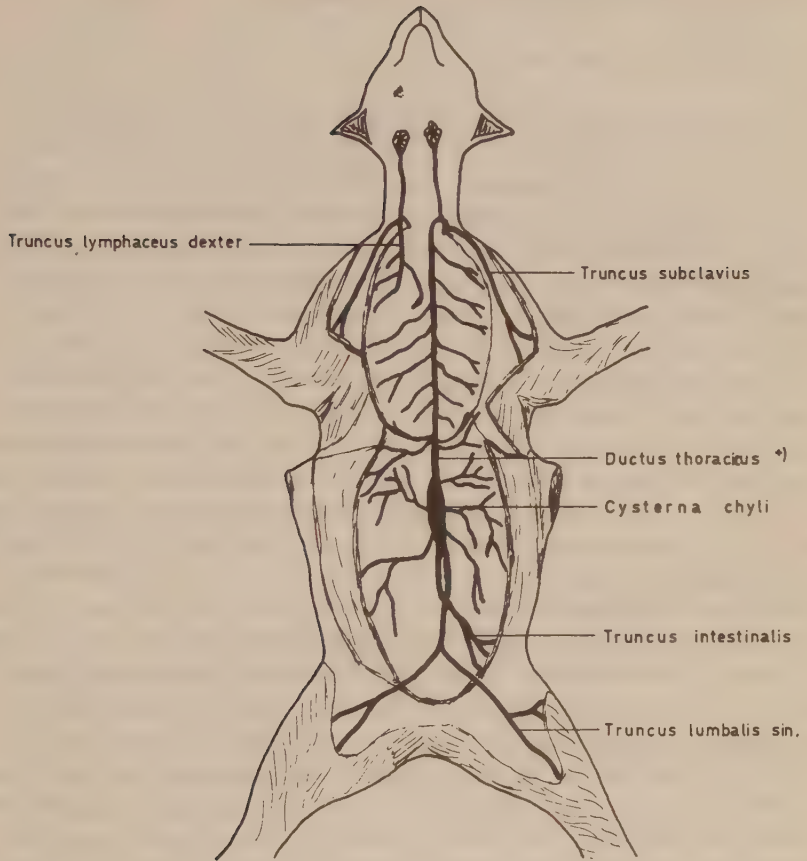
Die morphologische Unterscheidung der einzelnen Leukocyten-typen im Gemisch ist in der Zellelektrophoreseapparatur trotz 800-facher Vergrößerung nicht sicher möglich. Es wurde deshalb versucht, eine Suspension zu gewinnen, die nur einen Zelltyp enthält, um etwas über die Art der schnellen Leukocyten aussagen zu können. Da es sich jedoch als unmöglich erwies, die Leukocyten des Blutes in einer so schonenden Art und Weise zu trennen (THIERFELDER, 1964; SCHREK, 1964), daß die einzelnen Fraktionen anschließend noch für eine zellelektrophoretische Messung verwendet werden konnten, wurde es notwendig, den Ductus lymphaticus zu drainieren.

a) Das Lymphgefäßsystem der Ratte

Abb.4 zeigt das Lymphgefäßsystem der Ratte (YOFFEY, 1966). Es durchzieht genau wie das Blutgefäßsystem den ganzen Körper. Die Lymphe weist die gleiche Salzzusammensetzung wie das Plasma auf, enthält jedoch weniger Protein und als einzigen zellulären Bestandteil die Lymphocyten, die aus den Lymphknoten und der Milz stammen. Das System der Lymphgefäße beginnt in der Peripherie, wo die Lymphe aus den Blutkapillaren abfiltriert wird. Die Lymphgefäße führen die Lymphe in einer dem Venensystem parallelen Richtung; und das Sammelgefäß für den größten Teil der Körperlymphe, der Ductus thoracicus, mündet selbst schließlich in den linken Venenwinkel ein. Die Lymphe der rechten oberen Körperhälfte sammelt sich im Truncus lymphaceus dexter, welcher alsbald in den rechten Angulus venosus einmündet.

b) Methode

Durch Einführung eines feinen Polyäthylenschlauches (PE 60) mittels der BOLLMANN-Technik (BOLIMANN et al., 1948), modifiziert nach DELORME (1961), in den Ductus lymphaticus unterhalb des Zwerchfells konnte die Lymphe nach außen geleitet werden. Es wurde so eine reine Lymphocytensuspension erhalten.



*) Stelle der Ductusdrainage

Abb.4: Das Lymphgefäßsystem der Ratte (nach JOFFEY, 1966)

4. Der Impulshöhenanalysator nach GUTMANN

a) Arbeitsweise des Gerätes

Der Impulshöhenanalysator (GUTMANN, 1966 a) arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie der von COULTER (1956) entwickelte Zellzähler, ist jedoch gegenüber den COULTER'schen Geräten hinsichtlich Genauigkeit und Aussagewert wesentlich verbessert.

Prinzip: Saugt man aus einem mit einer Elektrolytlösung gefüllten Raum 1 eine Teilchensuspension durch ein kleines Loch in einen ebenso gefüllten Raum 2, so vergrößert sich der elektrische Widerstand zwischen zwei in Raum 1 und 2 eingetauchten Elektroden immer dann, wenn ein Teilchen geringer elektrischer Leitfähigkeit durch das Loch hindurchtritt. Ist das Teilchen gegenüber den Ausmaßen des Loches klein, ist die Widerstandsänderung dem Volumen des Teilchens nahezu proportional. Schickt man durch die zu messende Lösung einen konstanten Strom, so entstehen aus den Widerstandsänderungen gemäß dem Ohm'schen Gesetz ($U = R \cdot I$) Spannungsänderungen und durch Differenzieren dieser Spannungsänderungen Spannungsimpulse, deren Höhe ein Maß für das Volumen ist. Mit der COULTER'schen Meßanordnung kann man daher die Verteilungskurve der Volumina einer Zellpopulation aufnehmen, wenn man die statistische Verteilung der Impulshöhen ermittelt.

Ausführung: Ein praktisch konstanter Strom wird durch die zu untersuchende Lösung geschickt. Die Spannungsimpulse, die beim Durchsaugen durch die Kapillare entstehen, werden verstärkt und einem Diskriminator zugeführt. Dieser ist mit einer Diode ausgestattet, deren Vorspannung an einem mit einem 100-teiligen Skalenrand versehenen Potentiometer eingestellt werden kann. Alle Impulse, die größer als die eingestellte Spannung sind, werden gezählt. Es müssen mehrere Einzelmessungen zur Ermittlung der Volumenverteilung durchgeführt werden. Durch Verschieben der Schwelle des Diskriminators von Messung zu Messung um den gleichen Betrag erhält man die Summenhäufigkeitsfunktion, vorausgesetzt, die Anzahl der untersuchten Zellen ist nach jeder Verschiebung gleich. Durch Differenzieren erhält man aus der Summenhäufigkeitsfunktion die gewünschte Verteilungsfunktion.

b) Berechnung des Zellvolumens

Mithilfe der Formel

$$V = \frac{R^4}{\vartheta \cdot D} \cdot \bar{x}$$

kann das Durchschnittsvolumen der gemessenen Zellen errechnet werden. Dabei bedeutet $\bar{x}$ den Mittelwert der Meßwerte und R den Radius der Kapillare (= 50 μ), ϑ ist der spezifische Widerstand (im Durchschnitt 67 Ω cm) und D ist ein Eichfaktor, nämlich derjenige Diskriminatorwert, der einer Widerstandsänderung von 1 Ω entspricht. Bei den Versuchen lag der Eichfaktor zwischen 174 und 179.

5. Markierungsversuche an Rattenlymphocyten

a) Material

Für alle Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200-250 g verwendet. Das Medium bei der Zellmarkierung bestand aus:

80 Teile Gewebekulturmedium Nr.199 (Fa.Behring, Marburg/Lahn)

20 Teile Phosphatpuffer (pH 7,4)

1 Teil Rattenserum

0,5 Teile 10%ige Glucose

und 500 E Heparin und 10 mg Streptomycin/100 ml.

b) Gewinnung der elektrophoretisch langsamen Lymphocyten-suspension (Typ A)

100 ml Blut wurden von 10 Ratten mit Heparin abgenommen und mit 25 ml Dextran (MG 150000; 5 %ig in physiologischer Kochsalzlösung) versetzt. Nach gutem Durchmischen und Aufziehen in Glasröhren von ca 1 cm Dicke wurde das Gemisch 30 Minuten in einem Winkel von 45° und 30 Minuten senkrecht bei einer Temperatur von 4°C zur Senkung aufgestellt. Durch die Dextranzugabe kommt es zu einem schnellen Absinken der Erythrocyten, wobei sich die

Leukocyten im Überstand anreichern. Der Überstand wurde abpipettiert, mit ca 5 ml 1 %igem EDTA versetzt, um ein Klumpen der Zellen, insbesondere der Thrombocyten zu verhindern, und 15 Minuten bei 150 g zentrifugiert. Die Thrombocyten blieben bei dieser Tourenzahl zum größten Teil im Überstand, während die Lymphocyten sedimentierten. Der Niederschlag wurde in soviel physiologischem Medium aufgenommen, daß man eine Leukocytenkonzentration von ca 10^8 Zellen/ml erhielt. Ausstriche, die mit der panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM (ROMEIS, 1948) gefärbt und anschließend differenziert wurden, zeigten, daß es sich bei den Zellen zu etwa 97 % um Lymphocyten handelt. Der Rest waren Granulocyten und Monocyten, deren Prozentsatz noch durch die Adsorption dieser Zellen an Glaswände während der folgenden Inkubation bei 37°C verringert wurde (SCHREK, 1964).

c) Gewinnung der elektrophoretisch schnellen Lymphocyten-suspension (Typ B)

Die Ratten bekamen eine Ganzkörperbestrahlung von 800 R und anschließend wurde ihre Lymphe mittels Ductusdrainage bis zu 2 Stunden nach der Bestrahlung gesammelt. Im Auffanggefäß, welches bei 0°C gehalten wurde, befanden sich 5 ml Ringerlösung und 200 E Heparin. Für einen Versuch wurde die Lymphe von 1-4 Ratten gesammelt. Danach wurde 15 Minuten bei 150 g zentrifugiert und die Zellen in neuem Medium resuspendiert.

d) Gewinnung eines Gemisches aus Typ A und Typ B

Dazu wurde die Lymphe normaler Ratten gesammelt und in gleicher Weise aufbereitet, wie in Punkt c) erläutert wurde.

e) Radioaktive Markierung der Lymphocyten mit H^3 -Adenosin

Die Lymphocyten wurden in vitro mit H^3 -Adenosin (Farbwerke Höchst AG., spez. Aktivität 3,45 C/mmol) markiert. Dazu wurden sie in einem physiologischem Medium, welches $10 \mu\text{C/ml}$ H^3 -Adenosin enthielt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation und dem Umfüllen in ein anderes Zentrifugenglas zum Abtrennen der sich an die Glaswände adsorbierten Granulocyten, wurden die Zellen 15 Minuten bei 150 g abzentrifugiert, einmal mit nicht radioaktiven Medium gewaschen

und vor der Injektion in neuem Medium, das kein Heparin enthielt, wieder aufgeschwemmt. Von dieser Suspension wurde nach Verdünnung mit 1 %iger Essigsäure die genaue Zellkonzentration durch Zählung in einer Zählkammer nach NEUBAUER bestimmt. Die Überlebensrate wurde mithilfe von Trypanblau (siehe Methode 8) ermittelt. Sie betrug bei allen Versuchen über 96 %. Außerdem wurden Ausstriche angefertigt, um mittels Autoradiographie den Prozentsatz der Markierung zu ermitteln und um bei den Lymphocyten aus dem Blut durch Färbung nach PAPPENHEIM und anschließender Differenzierung die Verunreinigung durch Granuloocyten festzustellen.

f) Injektion der Lymphocytensuspensionen

Die markierten und in physiologischem Medium ohne Heparin aufgeschwemmten Lymphocyten wurden unter Äther- oder Chloralhydratnarkose einer männlichen Sprague-Dawley Ratte in die Vena femoralis injiziert. Die Konzentration betrug ca 10^7 Zellen/ml. Es wurde sehr langsam gespritzt, um ein vermehrtes Abfangen der Zellen durch die Lungenkapillaren zu verhindern; die Injektion von 8 ml Suspension erfolgte im Durchschnitt in 30 Minuten.

g) Autoradiographie

24 Stunden nach der Transfusion der markierten Lymphocyten wurde den Empfängertieren der Ductus drainiert und Ausstriche von der Lymphe hergestellt. Blut wurde einmal als einfacher Ausstrich von Schwanzblut und zum anderen nach Dextranzugabe und Schrägsenkung von Venenblut untersucht. Beide Methoden ergaben gleiche Ergebnisse. Von jeweils einem Bauchlymphknoten, Halslymphknoten, von der Milz und dem Thymus wurden Tupfpräparate angefertigt, wobei die entsprechenden Organe an verschiedenen Stellen durchgeschnitten und mit der Schnittfläche auf einen Objektträger aufgetupft wurden. Knochenmark für Ausstriche wurde aus dem Femur gewonnen.

Alle Präparate wurden, nachdem sie lufttrocken waren, 10 Minuten in 98 %igen Methylalkohol fixiert. Anschließend wurde zweimal für je 10 Minuten durch eisgekühlte 5 %ige Trichloressigsäure alle löslichen radioaktiven Substanzen herausgewaschen und danach 15 Minuten unter fließendem Wasser gewässert.

Durch Eintauchen der Präparate in eine Lösung von 0,5 % Gelatine und 0,05 % Chromalaun und anschließendes Trocknen wurde für eine bessere Haftung des Strippingfilmes gesorgt. Es wurde Kodak AR 10 Strippingfilm verwendet.

Nach 14 tägiger Belichtung wurde 5 Minuten bei 20°C mit Kodak D 19b Entwickler entwickelt. Zeit und Temperatur müssen bei allen zu vergleichenden Versuchen genau eingehalten werden, da sonst unterschiedliche Schwärzungsgrade auftreten, die falsche Markierungsintensitäten vortäuschen können. Anschließend wurde mit Aqua dest. abgespült, 10 Minuten fixiert und zweimal 10 Minuten in Aqua dest. gewässert. Gefärbt wurden die Ausstriche mit der panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM, die etwas modifiziert wurde (2 Minuten konz. May-Grünwald-Lösung, 2 Minuten Aqua dest. und 20 Minuten Giemsa-Lösung, die mit einem Tropfen Stammlösung auf 1 ml Aqua dest. hergestellt worden war). Nach der Färbung wurden die Präparate an der Luft trocknen gelassen.

6 Agglutinationstest zur Bestimmung der Serumantikörper bei der Maus

Mäusen, die gegen menschliche Erythrocyten der Blutgruppe 0 immunisiert worden waren, wurde Blut zur Antikörperbestimmung mittels einer Glasspritze unter Äthernarkose aus der aufgeschnittenen Vena subclavia entnommen. Durch anschließendes Zentrifugieren wurde Serum gewonnen und davon mit physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zu jeder Probe wurden 0,2 ml einer 1 %igen Suspension der gleichen Erythrocyten gegeben, die zur Immunisierung benutzt worden waren. Nach kräftigem Schütteln wurden die Röhrchen 45 Minuten bei 37°C und 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Daraufhin wurde der Titer desjenigen Röhrchens ermittelt, welches noch Agglutination zeigte.

7. Plaque-Test nach JERNE zum Nachweis Antikörper-bildender Zellen

Für den Test wurden in Zentrifugenröhrchen, die in einem Wasserbad von 45°C standen, je 2 ml Serva-Agarose, die 0,7 %ig

in PILLEMER-Puffer gelöst worden war, 0,05 ml einer dreimal gewaschenen 25 %igen Schaferythrocyten-Suspension und 0,05-0,1 ml der zu untersuchenden Zellsuspension gegeben.

Herstellung des PILLEMER-Puffers:

PILLEMER-Puffer wird 5fach konzentriert hergestellt und muß vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnt werden. Er hat folgende Zusammensetzung

NaCl	42,50 g
Veronal	2,87 g
Veronal-Natrium	1,87 g
M- $MgCl_2 \times 6 H_2O$	2,50 ml
M- $CaCl_2$	0,75 ml

Die Substanzen müssen einzeln in heißem Aqua dest. gelöst und dann auf 1000 ml aufgefüllt werden.

Die Zellkonzentration, die in Vorversuchen ermittelt wurde, wurde so gewählt, daß ca 200 Plaques/Platte zu erwarten waren. Die Überlebensrate der verwendeten Zellen war vorher mittels des Trypanblautestes bestimmt worden (siehe Methode 8).

Nach gutem Schütteln wurde das Gemisch in 45°C vorgewärmte Petrischalen ausgegossen. Nachdem die einzelnen Platten bei 40-facher Vergrößerung auf Artefakte hin untersucht worden waren, kamen sie für eine Stunde in einen Wärmeschrank von 37°C. Anschließend wurde je 3 ml Meerschweinchen-Komplement (Konserviertes Meerschweinchenkomplement, Behringwerke AG, Marbeurg/Lahn) zugegeben und wieder 30 Minuten bei 37°C inkubiert; das Komplement wurde zuvor durch dreimaliges Reagierenlassen mit Schaferythrocyten während je 15 Minuten im Eisbad und anschließendes Zentrifugieren von unspezifischen Störfaktoren gereinigt. Außerdem wurde das Komplement vor Gebrauch 1:10 mit PILLEMER-Puffer verdünnt. Nach Beendigung der halbstündigen Inkubation wurde das Komplement abgegossen und die Plaques ausgezählt.

8. Bestimmung der Überlebensrate von Zellen mithilfe des Trypanblau-Testes

1 Tropfen der zu untersuchenden Zellsuspension und 1 Tropfen 0,1 %iger Trypanblaulösung in physiologischer Kochsalzlösung wurden auf einem Objektträger verrührt und mit einem Deck-

gläschen bedeckt. Bei 800-facher Mikroskopvergrößerung wurde dann die Überlebensrate bestimmt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff kaum auf und erscheinen deshalb farblos bis blaß-blau, während tote Zellen intensiv blau gefärbt sind.

9. Durchführung von Röntgenbestrahlungen

Alle in vivo und in vitro Röntgenbestrahlungen wurden mit einer Bestrahlungsanlage der Fa.Siemens-Reiniger, Erlangen, und einem Duplex-Dosimeter durchgeführt. Es herrschten folgende Bedingungen: 280 kV, 10 mA; 1,0 mm Cu; Abstand 50 cm; Dosisleistung 1 R/sec.

III. E r g e b n i s s e

A) Versuche zur Identifizierung der Fraktion elektrophoretisch schneller Leukocyten, die nach bestimmten Reizen im Blut auftreten

1. Das Hämocytogramm der normalen Ratte

Das Blut von 11 normalen Ratten wurde zellelektrophoretisch untersucht. Von jeder Probe wurden ca 20 Zellen gemessen. Die Ergebnisse von allen Tieren wurden zusammengefaßt und in einem Histogramm dargestellt. Hierbei wurde auf der Ordinate die Anzahl der Zellen und auf der Abszisse die gemessene Zeit t (sec) für eine im elektrischen Feld zurückgelegte Wegstrecke von 32 μ aufgetragen. Außerdem wurden die den gemessenen Zeiten entsprechenden elektrophoretischen Beweglichkeiten angegeben (Abb.5).

Auf die Darstellung der Erythrocytenfraktion wurde in der Abbildung verzichtet, da sie für die vorliegende Problemstellung ohne Bedeutung ist. Für die einzelnen Zelltypen wurden die Mittelwerte der elektrophoretischen Beweglichkeit sowie ihre mittleren quadratischen Abweichungen berechnet. Dabei ergaben sich folgende Werte für das normale Hämocytogramm der Ratte:

Granulocyten: $b = 0,747 \pm 0,035 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$
 Lymphocyten: $b = 0,955 \pm 0,052 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$
 Erythrocyten: $b = 1,220 \pm 0,040 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$

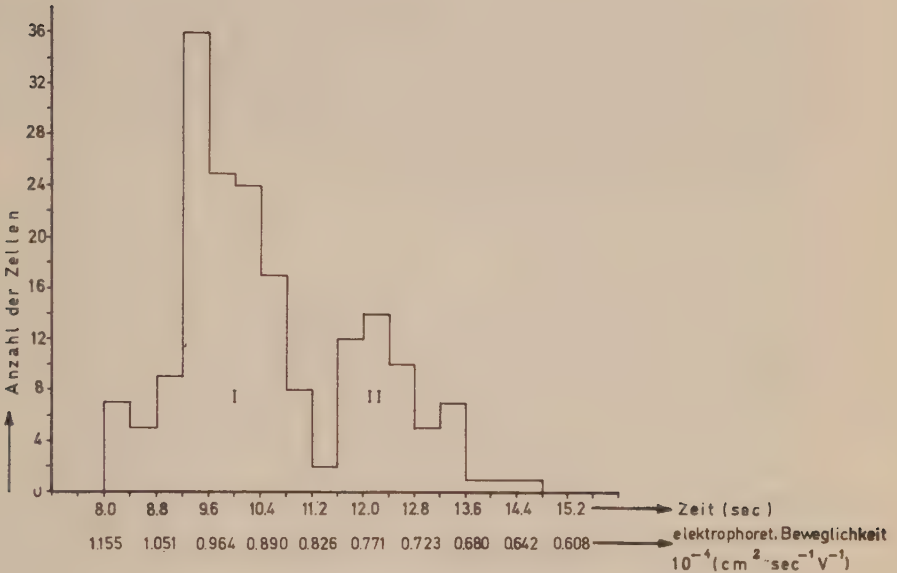


Abb.5: Das Hämocytopherogramm der normalen Ratte (Der Block der Erythrocyten wurde weggelassen).

I = Lymphocyten; $b = 0,955 \pm 0,052 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$
 II = Granulocyten; $b = 0,747 \pm 0,035 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$

2. Das Auftreten der schnellen kernhaltigen Zellfraktion im Hämocytopherogramm der Ratte

a) nach Röntgenganzkörperbestrahlung

Wie bereits erwähnt, konnte ARNOLD (1964) zeigen, daß nach Ganzkörperbestrahlung einer Ratte mit 800 R eine neue elektrophoretisch schnelle Zellfraktion im Hämocytopherogramm auftritt. Diese Versuche wurden an 8 Ratten wiederholt; im Zeitraum von 45 Minuten bis zu 6 Stunden nach der Bestrahlung wuchs der Anteil dieser schnellen kernhaltigen Fraktion bis zu 50 % aller gemessenen kernhaltigen Blutzellen.

b) nach Alkoholinjektion

Es zeigte sich, daß auch nach einer Injektion von Alkohol elektrophoretisch schnelle Zellen im Blut auftreten. Als Versuchstiere wurden Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 100-150 g verwendet. Insgesamt wurden 35 Ratten mit einem Gemisch aus 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung gespritzt. Es machte keinen Unterschied ob die Dosis intravenös oder intraperitoneal verabreicht wurde. Von den Ratten wurden 15 Tiere nach 5-10 Minuten, 5 nach 15 Minuten, 8 nach 30 Minuten, 2 nach 45 Minuten und 5 1-2 Stunden nach der Injektion entblutet. Das Blut wurde für die zellelektrophoretische Messung präpariert und von jeder Probe wurden 20 Zellen gemessen. In Abb.6 wurde der prozentuale Anteil elektrophoretisch schneller Leukocyten von der Gesamtleukocytenanzahl in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen Alkoholinjektion und Blutentnahme verstrich, aufgetragen. Der Maximaleffekt trat 15 Minuten nach der Injektion ein, wo 31 % elektrophoretisch schnelle Zellen gefunden wurden. Die Wirkung des Alkohols läßt schnell nach: Schon nach 1 Stunde findet man wieder ein normales Hämocytopherogramm vor.

Abb.7 zeigt das Summen-Hämocytopherogramm von 20 Tieren, denen das Blut 5-15 Minuten nach Alkoholinjektion entnommen wurde. Auf der Ordinate wurde wieder die Anzahl der Zellen und auf der Abszisse die gestoppte Zeit in sec für eine Strecke von 32 μ sowie die daraus errechnete Beweglichkeit aufgetragen. Man erkennt deutlich,

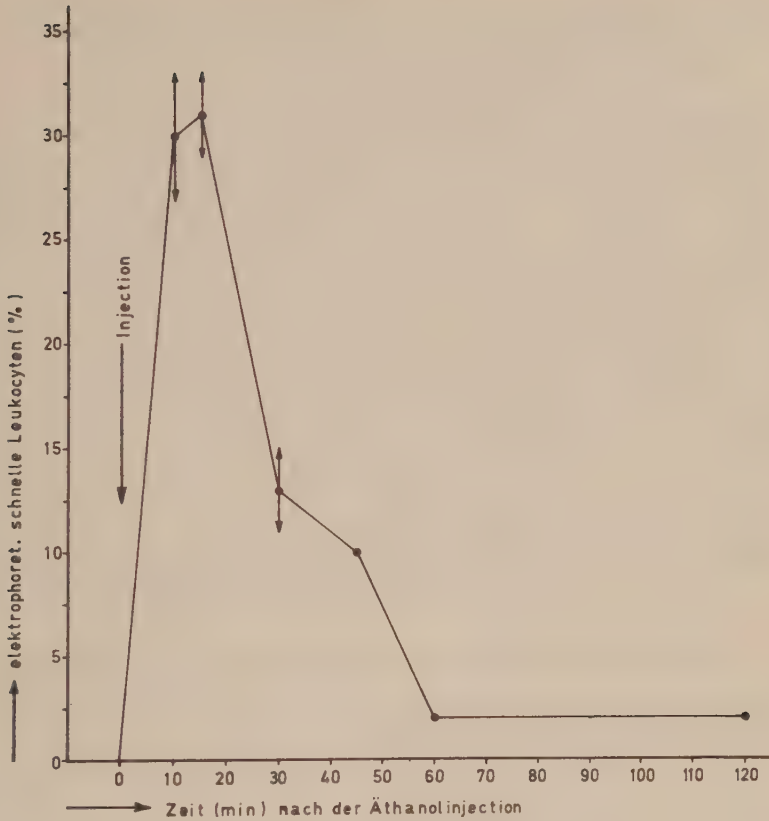


Abb.6: Das Auftreten elektrophoretisch schneller Leukocyten
im Blut von Ratten nach Alkoholinjection
Die Pfeile geben die Streuung an.

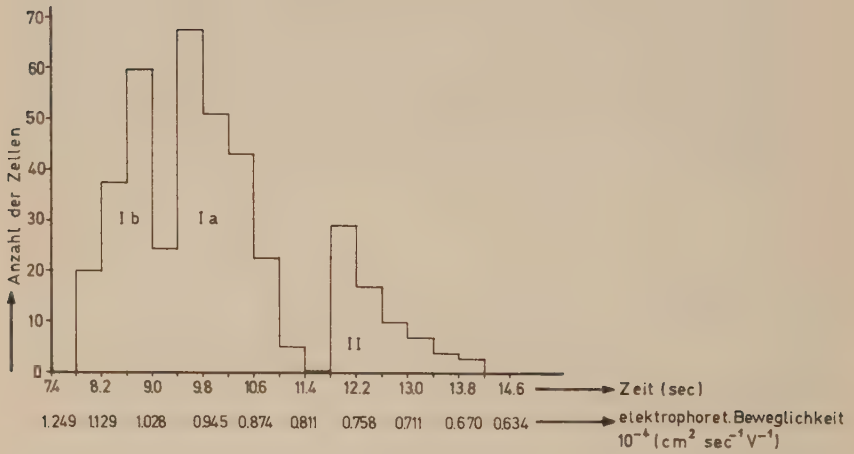


Abb.7: Das Hämoctophorogramm von 20 Ratten 5-15 Minuten nach der Alkoholinjektion

Ia = Lymphocyten

Ib = neuauftretende Zellen;
 $b = 1,090 \pm 0,039 \times 10^{-4} [\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}]$

II = Granulocyten

daß neben den beiden Blöcken des normalen Hämoctophorogramms, den Granulocyten und den Lymphocyten, eine 3. Zellfraktion auftritt, für die eine elektrophoretische Beweglichkeit von $b = 1,090 \pm 0,039 \times 10^{-4} [\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}]$ errechnet wurde.

Der Vorteil der Alkoholinjektion gegenüber einer Ganzkörperbestrahlung als Modell zur Untersuchung der schnellen Zellen im Blut liegt in der viel besseren Reproduzierbarkeit und einer viel geringeren Streuung der Ergebnisse.

Um eine unmittelbare Wirkung des Alkohols auf die Leukocyten auszuschließen, wurde das mit Heparin abgenommene Blut von 6 Ratten mit 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und 5 Minuten bei 37°C oder 15 Minuten bei 23°C in einem Wasserbad geschüttelt. Bei der anschließenden zellelektrophoretischen Untersuchung fanden sich niemals mehr als 5 % elektrophoretisch schnelle Zellen, was auch im normalen Hämoctophorogramm vorkommt. Die in vitro Inkubation bei 37°C konnte nicht über 5 Minuten hinaus ausgedehnt werden, da längeres Schütteln von Blut bei 37°C schon ohne Alkoholzugabe zu Membranveränderungen führt.

3. Auswirkung der Alkoholinjektion auf das periphere Blutbild der Ratte

Um eine mögliche Beziehung zwischen Veränderungen im peripheren Blutbild und dem Auftreten von elektrophoretisch schnellen Zellen im Hämoctophorogramm zu erfassen, wurden von 10 Ratten, denen ein Gemisch von 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert worden war, die Leukocyten gezählt und in einem nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich differenziert. Das Blut dazu wurde vor der Injektion und 1/2 Stunde, 1 Stunde, 1 1/2 Std., 2 Std., 5 und 8 Stunden danach aus dem Schwanz entnommen. 10 andere Ratten des gleichen Stammes wurden zur Kontrolle mit 0,4 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt und zu den gleichen Zeiten untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Dabei wurden auf der Ordinate die Lymphocytenwerte in % des Ausgangswertes und auf der Abszisse die Zeit nach der Injektion in Stunden aufgetragen.

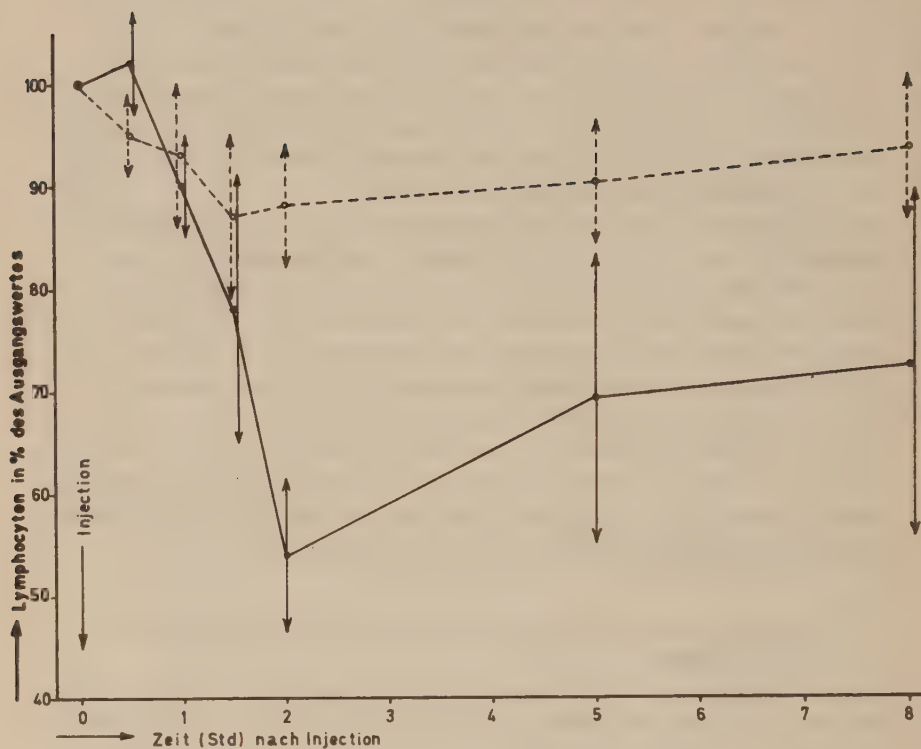


Abb.8: Die Auswirkung einer Alkoholinjektion auf die Blut-lymphocyten der Ratte

- — ● Mittelwerte von 10 Ratten nach Injektion von 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung
- - - ○ Mittelwerte von 10 Ratten nach der Injektion von 0,4 ml physiologische Kochsalzlösung

Die eingezeichneten Pfeile geben die Streuung wieder.

Die Wirkung des Alkohols auf das periphere Blutbild besteht in einer Depression der Lymphocyten: Sie fielen innerhalb von 2 Stunden bis auf 44 % ihres Ausgangswertes ab und stiegen dann wieder langsam an. Die Kontrollwerte dagegen fielen nur bis auf 87 % ihres Ausgangswertes ab und wiesen eine viel geringere Streuung zwischen den einzelnen Tieren auf. Demnach ist der ausgeprägte Lymphocytensturz auf eine Alkoholwirkung zurückzuführen. Der Zeitpunkt des steilsten Abfalls der Lymphocytenwerte deckt sich mit dem Auftreten von elektrophoretisch schnellen Zellen im Hämocytopherogramm.

4. Zellelektrophoretische Untersuchung von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus

13 normalen Ratten wurden Lymphproben entnommen und von jeder ca 20-30 Zellen gemessen, insgesamt waren es 308 Zellen. Die gemessenen Zeiten wurden in 10 Klassen mit einer Klassenbreite von 4/10 Sekunden eingeteilt. Wurde die Klassenhäufigkeit als Funktion der Klassennummer graphisch dargestellt, so erhält man ein rechtsschiefes Histogramm (Abb.9), das in folgender Weise (GUTMANN, 1966 b) auf das Vorliegen einer Mischpopulation geprüft wurde. Durch Spiegelung der linken Kurvenseite um den Maximalwert erhält man den Kurvenast a. Die Differenz aus der rechten Kurvenseite und a ergibt b. Bei Übertragung der Kurven auf Wahrscheinlichkeitspapier (Abb.10) erwiesen sich die beiden neuen Histogramme im Gegensatz zum ursprünglichen Histogramm als gerade Linien. Dies bedeutet, daß es sich um 2 Gauß'sche Normalverteilungen handelt.

Für die Kurve I, die 77 % der Zellen umfaßt, wurde eine mittlere elektrophoretische Beweglichkeit von $b = 1,060 \pm 0,066 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ und für die Kurve II, die 23 % der Zellen einschließt, ein $b = 0,930 \pm 0,050 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ erhalten. Die elektrophoretisch langsamere der normalen Lymphocytenpopulationen des Ductus thoracicus wird im folgenden als Typ A, die schnellere als Typ B bezeichnet.

Inwieweit die Wahrscheinlichkeit der Existenz dieser 2 Populationen statistisch gesichert oder ob ihr Auftreten nur zufällig

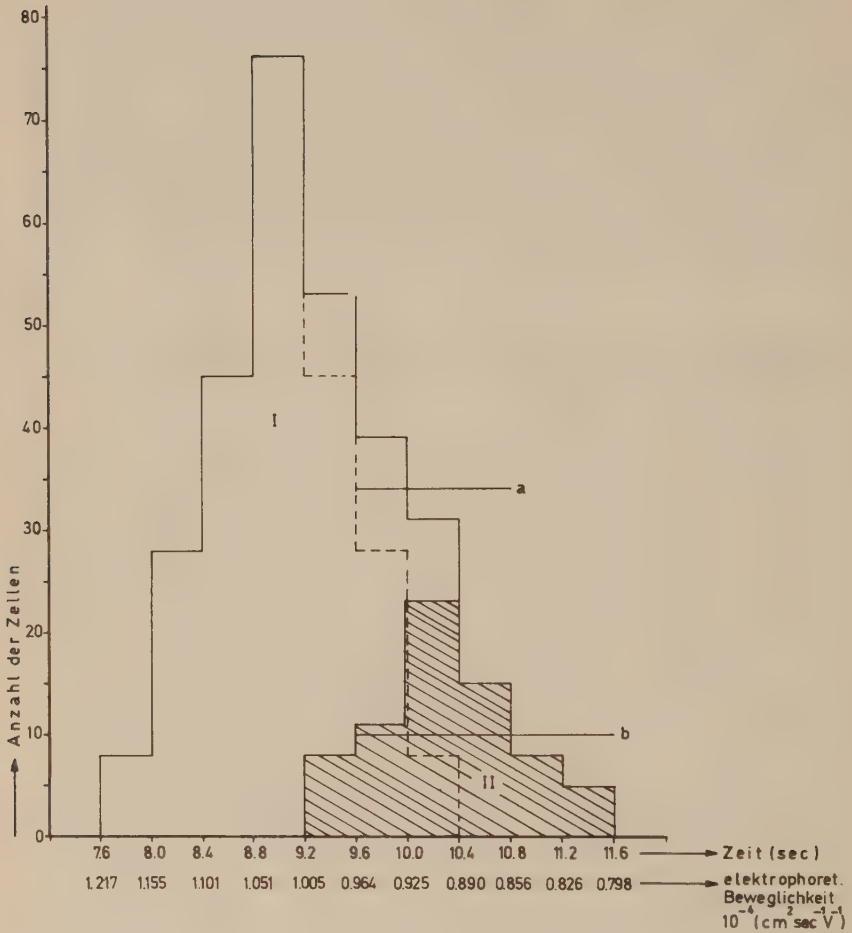


Abb.9: Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus der normalen Ratte in physiologischer Kochsalzlösung

Teilkurve I (77% der Zellen): $b = 1,060 \pm 0,066 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$

Teilkurve II (23% der Zellen): $b = 0,930 \pm 0,050 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$

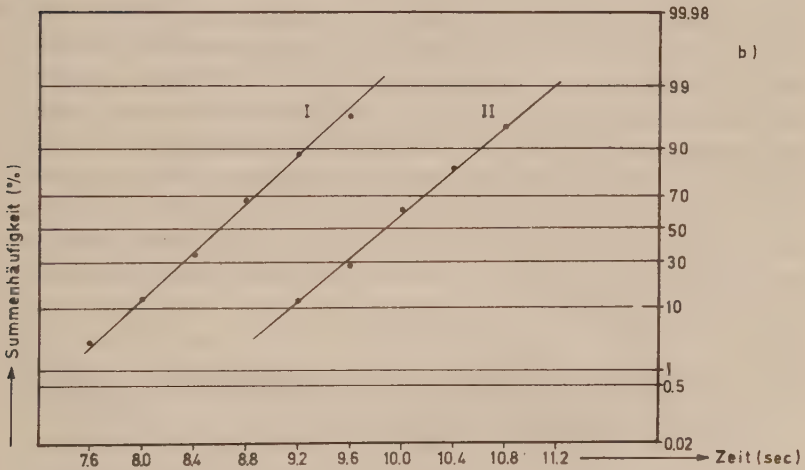
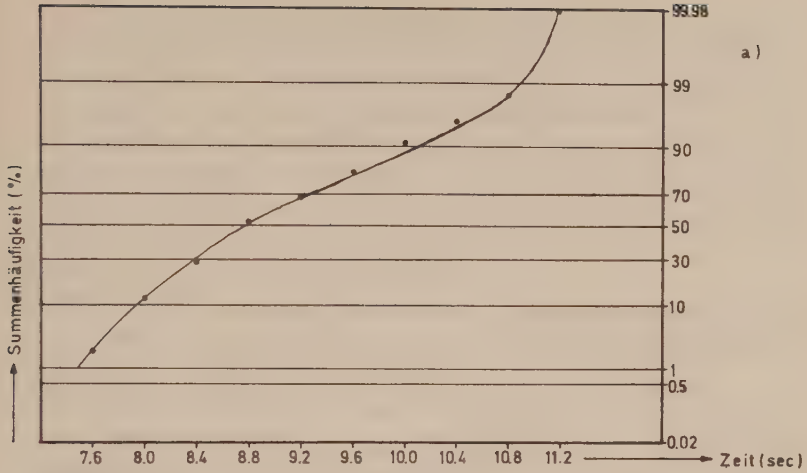


Abb.10: Prüfung der Histogramme aus Abb.9 im Wahrscheinlichkeitsnetz auf GAUSSsche Normalverteilung (Geraden)
a) die ursprüngliche Gesamtkurve
b) die beiden Teilkurven I und II

ist, wurde durch einen t-Test geprüft.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d} \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

$$s_d^2 = \frac{s_1^2 (N_1 - 1) + s_2^2 (N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}$$

Die Integralgrenzen der t-Verteilung für einen Meßwertumfang von 308 sind (GRAF-HENNING, 1953): S = 95 % : t = 1,968

S = 99 % : t = 2,592

S = 99,9% : t = 3,324

Der errechnete Wert für t (= 17,3) überschreitet weit die 3 s-Grenze; d.h. mit über 99 %iger statistischer Sicherheit enthält die Lymphe normaler Ratten 2 zellelektrophoretisch unterscheidbare Populationen von Lymphocyten.

Untersuchungen an Tieren, die mit verschiedenem Futter, M- bzw. R-Futter gefüttert worden waren, ergaben keine unterschiedlichen Befunde bei den Ductus-Lymphocyten. R ist ein normales Rattenfutter, M dagegen ein besonders energiereiches, das bei der Verfütterung an Tiere, die keiner besonderen Belastung unterworfen sind, bis zur adipösen Verfettung führt. Ebenfalls spielt es keine Rolle, ob die Lymphprobe unter Narkose über eine kurze Zeitspanne hinweg oder während 24 Stunden gesammelt wurde; in letztem Falle wurde die Ratte in einem speziell zu diesem Zweck angefertigten Käfig gehalten.

5. Wirkung einer Röntgenganzkörperbestrahlung auf die Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus

Folgende Experimente sollten zeigen, wie sich eine Ganzkörperbestrahlung auf die elektrophoretische Beweglichkeit der Ductus-Lymphocyten auswirkt.

Es wurden 10 Ratten mit je 800 R bestrahlt. Anschließend wurde der Ductus lymphaticus dieser Tiere drainiert und Lymphproben in Abständen von je einer Stunde gesammelt und nach entsprechender Aufbereitung zellelektrophoretisch ausgewertet. Schon kurze

Zeit nach der Bestrahlung verschwindet die Population der elektrophoretisch langsamen Lymphocyten vollständig; es finden sich bis zu 2 Stunden danach fast ausschließlich schnelle Lymphocyten ($b = 1,060 \pm 0,066 \times 10^{-4} [\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}]$) in der Lymphe. Die Strahlenwirkung läßt dann jedoch allmählich nach; 4-6 Stunden später finden wir wieder die Verhältnisse der normalen Lymphe vor. Kontrollmessungen, die zur gleichen Zeit am Blut dieser Tiere durchgeführt wurden, zeigten die unter 2.a) beschriebenen Ergebnisse.

In vitro Bestrahlungen mit 800 R von Lymphocyten von 5 normalen Ratten zeigten dagegen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen keine Veränderungen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß es sich bei den nach Ganzkörperbestrahlung auftretenden elektrophoretisch schnellen Zellen im Blut um Lymphocyten aus dem Ductus lymphaticus handelt.

Um diese Annahme zu stützen, wurden 10 Ratten, denen der Ductus thoracicus doppelt unterbunden worden war und 4 scheinoperierte Kontrollratten einer Ganzkörperbestrahlung von 800 R unterzogen. Das Blut dieser Tiere wurde nach 10 Minuten, 30 Minuten, 2,4 und 5 Stunden auf schnelle Zellen hin untersucht. Während sich im Blut der 4 Kontrolltiere, wie erwartet, nach der Bestrahlung elektrophoretisch schnelle Zellen fanden, zeigten alle Versuchstiere ein normales Hämoctopherogramm.

In gleicher Weise wurde 10 Ratten nach Ductusunterbindung ein Gemisch von 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. gespritzt. Das Blut dieser Tiere, welches 10 bis 15 Minuten später entnommen wurde, zeigte keine elektrophoretisch schnellen Zellen, bis auf 2 Tiere, die 10 und 15 % aufwiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Ductusunterbindung das Auftreten von schnellen Zellen nach einer Ganzkörperbestrahlung unterbindet.

Die Wirkung einer intravenösen Injektion von Alkohol auf die Ductus-Lymphocyten konnte nicht getestet werden; um nämlich eine genügend große Lymphprobe zu sammeln, benötigt man 30-40 Minuten und das überschreitet die Wirkungszeit des Alkohols (siehe Ergebnisse Abschnitt 2.b).

6. Auswirkung einer Unterbindung des Ductus thoracicus auf die Lebenserwartung, das Hämocytopherogramm und das Blutbild der Ratte

5 Ratten, denen der Ductus thoracicus doppelt unterbunden worden war, wurden in Einzelkäfige gesetzt und 3 Monate lang beobachtet. Sie überwandten den Eingriff relativ schnell und zeigten bereits 2 Tage nach der Operation keinerlei krankhaftes Verhalten mehr. Nach 3 Monaten wurden die Tiere getötet.

Je 2 Ratten, mit unterbundenem Ductus thoracicus, wurde 3 und 48 Stunden nach der Unterbindung Blut entnommen, das zell-elektrophoretisch untersucht wurde. Alle 4 Versuchstiere zeigten ein normales Hämocytopherogramm. Der Darm dieser Tiere war nicht gebläht, was darauf schließen läßt, daß der Lymphabfluß über kleinere Gefäße gewährleistet wurde, die nach der Ductusunterbindung in Funktion getreten waren. Um zu sehen, wie sich nach einer Ductusunterbindung das Blutbild verändert, wurden bei 5 Ratten, denen der Ductus doppelt unterbunden worden war, und bei 5 scheinoperierten Kontrollratten die Leukocyten gezählt und differenziert. Blutproben wurden aus der Schwanzvene vor der Operation und 1, 3,5 und 7 Stunden danach und an den darauffolgenden Tagen einmal täglich entnommen. Abb.11 zeigt die Ergebnisse. Es wurden die Mittelwerte aus den 5 Ratten aufgetragen; die Ordinate gibt den prozentualen Anteil der Lymphocyten, bezogen auf den Ausgangswert (= 100 %), die Abszisse die Zeit der Blutentnahme wieder.

In beiden Gruppen kommt es 3 Stunden nach der Operation zu einem Blutlymphocytensturz. Die Lymphocyten der Versuchstiere fallen auf 39 % ab, die der Kontrolltiere auf 49 %. Die Normalisierung der Werte scheint bei den Tieren, denen der Ductus unterbunden wurde, etwas langsamer vorsichzugehen als bei den Kontrollen, aber nach 2 Tagen sind auch bei diesen die Ausgangswerte wieder erreicht.

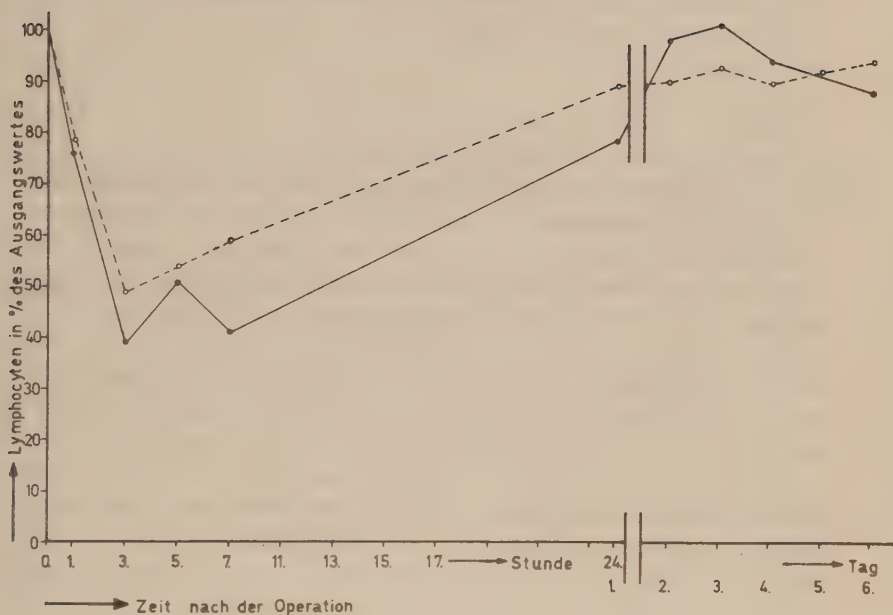


Abb.11: Auswirkung einer Unterbindung des Ductus thoracicus auf die Lymphocyten des peripheren Blutes bei der Ratte

- Mittelwerte von 5 Ratten, denen der Ductus unterbunden wurde
- Mittelwerte von 5 scheinoperierten Kontrollratten

7. Zellelektrophoretische Untersuchungen an lymphatischen Organen

Die bis jetzt beschriebenen Versuche sprechen dafür, daß es sich bei den elektrophoretisch schnellen Leukocyten um Lymphocyten handelt. Deshalb wurden die Untersuchungen auf die lymphatischen Organe der Ratte ausgedehnt.

a) Milz

Die zellelektrophoretische Untersuchung der Milzen von 7 Ratten ergaben außer einer sehr langsamen, breit streuenden Zellfraktion übereinstimmend 2 Gruppen von Zellen, die aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit offenbar lymphocytären Elementen angehören (Abb.12). Für sie wurden nämlich die elektrophoretischen Werte von $b_1 = 0,935 \pm 0,046 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ und $b_2 = 1,140 \pm 0,065 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ errechnet. Die Fraktion mit der Beweglichkeit von b_1 entspricht derjenigen der normalen Blutlymphocyten und die von b_2 jener, welche die neu auftretenden Lymphocyten des Blutes nach Alkoholinjektion und Röntgenbestrahlung besitzen. Die elektrophoretisch langsamste Zellgruppe entspricht in ihrer Beweglichkeit etwa den Blutgranulocyten, vielleicht sind aber in ihr noch andere Zellarten enthalten.

b) Lymphknoten

Die Messung von 9 Lymphknoten aus dem Hals- und Bauchraum der Ratte ergaben ähnliche Werte wie jene, die beim Menschen gefunden wurden (RUEFF, 1962). Die elektrophoretische Beweglichkeit des Hauptanteils der Zellen liegt in einem Doppelgipfel, der den normalen Blutlymphocyten und den elektrophoretisch schnellen Zellen entspricht. Die Streuung ist jedoch wesentlich breiter als bei den Ductus-Lymphocyten, ganz besonders zu den schneller beweglichen Zellen hin (Abb.13).

Ausstrichpräparate, die nach PAPPENHEIM gefärbt worden waren, zeigten, daß es sich fast ausschließlich um lymphocytäre Elemente handelt. Es fanden sich meist größere schwach granulierte Zellen mit einem runden Kern, und teilweise traten kleine

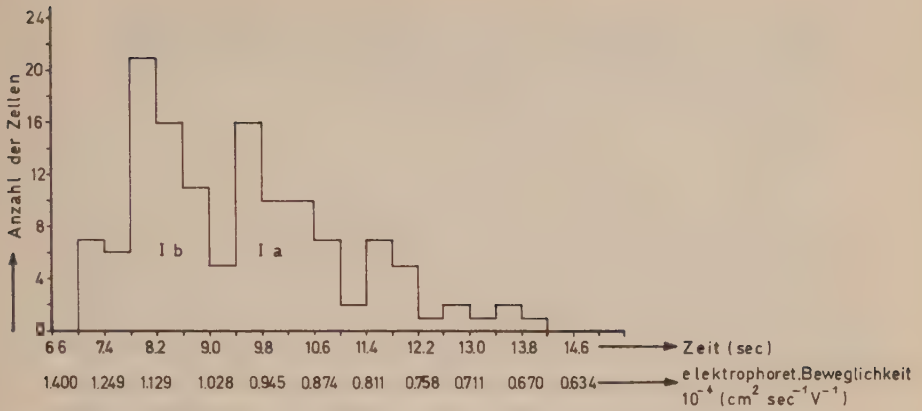


Abb. 12: Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit von Rattenmilzzellen in physiologischer Kochsalzlösung

Ia : $b = 0,935 \pm 0,046 \times 10^{-4} \sqrt{\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}}$ lymphocytäre
 Ib : $b = 1,140 \pm 0,065 \times 10^{-4} \sqrt{\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}}$ Elemente

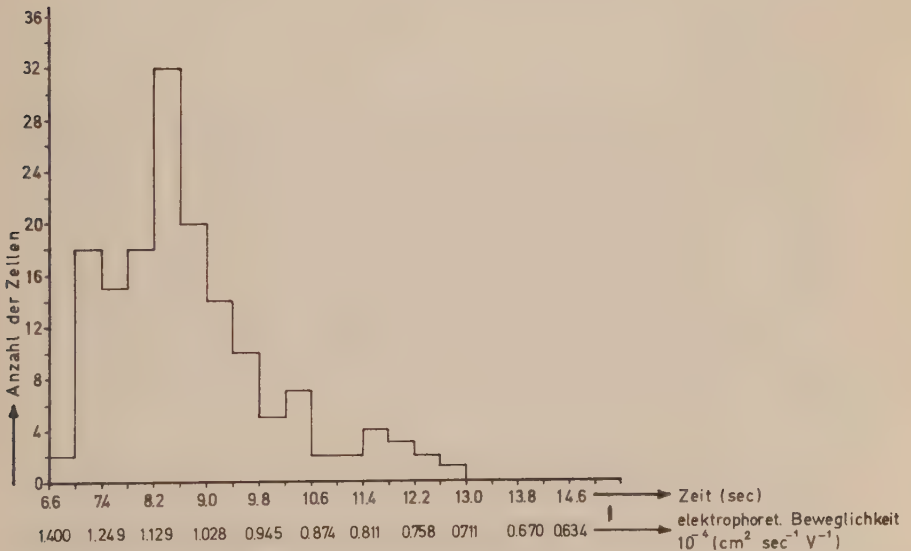


Abb. 13: Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit von Lymphknotenzellen der Ratte in physiologischer Kochsalzlösung

Lymphocyten mit ganz schmalem Plasmasaum in Erscheinung. Zwischen den Lymphknoten aus dem Hals- und aus dem Bauchraum zeigten sich keine Unterschiede.

c) Thymus

Die Thymi von 8 Ratten im Alter von 3 Wochen und 15 Mäusen im Alter von 3 Wochen und älter wurden in gleicher Weise wie die Lymphknoten präpariert und zellelektrophoretisch untersucht. Obwohl sich im nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich nur Zellen mit rundem, violett gefärbten Kern und blauem Cytoplasma, die sog. Thymocyten, fanden, wies das Histogramm der Ratten neben Zellen mit der Beweglichkeit der normalen Blutlymphocyten noch einen Block mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Granulocyten und eine dritte noch langsamer bewegliche Fraktion auf (Abb.14). Im Histogramm der Mäusethymi war diese dritte Fraktion besonders ausgeprägt (Abb.15). Dagegen fehlt im Thymus von Maus und Ratte die Fraktion der elektrophoretisch schnellen Leukocyten.

d) Knochenmark

Zellelektrophoretische Untersuchungen am Knochenmark der Ratte wurden bereits von ARNOLD (1964) vorgenommen. Er fand außer den 3 Fraktionen des normalen Hämoctophorogramms 2 Gruppen schnell beweglicher kernhaltiger Zellen. Diese Befunde habe ich an 3 Ratten wiederholt und bestätigen können. Diese schnell beweglichen Zellen sind jedoch schon im Zytopherometer als große und stark granulierte Zellen zu erkennen. Sie sind morphologisch deutlich von den Zellen zu unterscheiden, die nach Restrahlung und Alkoholinjektion im Blut auftreten.

8. Einfluß der Milz auf das Auftreten von elektrophoretisch schnellen Leukocyten

RUHENSTROTH-BAUER et al.(1963) haben gezeigt, daß bei Ratten, die vor einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R splenektomiert worden waren, die Fraktion elektrophoretisch schneller Blut-



Abb.14: Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit von Thymuszellen der Ratte in physiologischer Kochsalzlösung

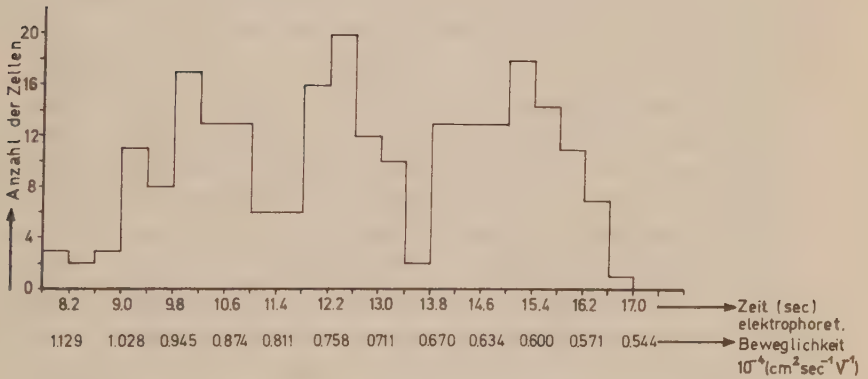


Abb.15: Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit von Thymuszellen der Maus in physiologischer Kochsalzlösung

lymphocyten fehlt: Das Hämocytopherogramm entspricht völlig dem von unbehandelten Tieren. Lag die Splenektomie jedoch mehr als 4 Wochen zurück, so fanden sich nach einer Röntgenbestrahlung dieser Tiere wieder elektrophoretisch schnelle Zellen im Blut (FEESER, 1966).

Um den Einfluß der Milz auf das Verhalten der Ductus-Lymphocyten zu untersuchen, wurde 5 Ratten der Ductus thoracicus drainiert und, nachdem eine Lymphprobe für die Kontrollmessungen entnommen worden war, wurden die Tiere splenektomiert und anschließend einer Röntgenganzkörperbestrahlung von 800 R unterzogen. Dann wurden Lymphproben 1,2,3 und 7 Stunden nach der Bestrahlung gesammelt und zellelektrophoretisch untersucht. Die Bestrahlung verursachte in diesem Fall keine Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit der Ductus-Lymphocyten, sie zeigten das gleiche Bild wie die Kontrollmessungen.

Lag die Splenektomie 4-5 Wochen zurück, so verliefen analoge Versuche an 8 Tieren uneinheitlich. Diese 8 Ratten bekamen 3 Tage vor der Splenektomie zur Verhinderung einer Bartonelleninfektion je 3 mg Neosalvarsan intraperitoneal verabreicht und wurden frühestens 4 Wochen später mit 800 R bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde diesen Tieren der Ductus drainiert und die Lymphen zellelektrophoretisch untersucht.

Während sich im Blut schon 1 Stunde und auch noch 4 Stunden nach der Bestrahlung elektrophoretisch schnelle Zellen fanden, zeigten sich in der Lymphe nur eine kurzfristige und geringe Verschiebung der Lymphocytenbeweglichkeit zugunsten der schnellen Fraktion. Bei 2 Ratten trat diese Verschiebung nur in der ersten Stunde nach der Bestrahlung auf, bei den anderen 6 Ratten fand sich direkt nach der Bestrahlung kein Effekt, sondern erst 2-3 Stunden später und dann auch nur in geringem Ausmaß.

8 weiteren Ratten wurden splenektomiert und anschließend mit einem Gemisch von 0,2 ml 96 %igen Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung gespritzt. Das Blut wurde zwischen 10- und 15 Minuten entnommen. Es zeigte sich, daß eine Alkoholinjektion auch nach Splenektomie zum Zirkulieren von elektrophoretisch schnellen Leukocyten im Blut führt, allerdings wurden nie mehr als 20 % gefunden. Diesen Ergebnissen nach kann die Milz als hauptsächlichstes Ursprungsorgan für die elektropho-

retisch schnellen Blutlymphocyten nach den genannten Reizen
angesehen werden.

- B) Unterteilung der morphologisch "kleinen" Lymphocyten nach ihrem Volumen und ihrer Funktion

1. Volumenmessung an Rattenlymphocyten mittels des Impulshöhenanalysators nach GUTMANN

- a) Messungen an Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus

Einzelne Lymphproben von insgesamt 7 Ratten wurden durch Drainage des Ductus thoracicus gewonnen. Durch Verdünnen mit entsprechenden Puffern wurde die Zellkonzentration so eingestellt, daß in der Zeit von 8 Sekunden ca 6-7000 Zellen vom GUTMANN - Apparat gezählt wurden. Als Puffer wurden Michaelis-Puffer (MICHAELIS, 1931), Natrium-Kalium-Phosphatpuffer nach OULIE (1958) oder physiologische Kochsalzlösung verwendet. Es wurden von jeder Lymphprobe mehrere Zählungen vorgenommen; die Abweichungen betrugen nur wenige Prozent. Die Meßwerte wurden auf Millimeterpapier aufgezeichnet; die Ordinate zeigt die Häufigkeit und die Abszisse die Diskriminatoreinstellung an.

Das so erhaltene Histogramm ist deutlich rechtsschief und kann wie das Histogramm der elektrophoretischen Beweglichkeit der Ductus-Lymphocyten in 2 symmetrische Histogramme zerlegt werden: Durch Spiegelung der linken Kurvenseite a um den Maximalwert erhält man den Kurvenast b. Für jede Klasse wurde dann die Differenz zwischen a und b' ermittelt und eingezeichnet, wodurch Kurve c entsteht (Abb.16).

Bei Übertragung der Kurven auf Wahrscheinlichkeitspapier (Abb.17) erwiesen sich die beiden neuen Histogramme im Gegensatz zum ursprünglichen als gerade Linien. Das bedeutet, daß die Zellen der normalen Rattenlymphe als ein Gemisch von 2 normalverteilten Lymphocytenpopulationen mit unterschiedlichem Volumen anzusehen sind.

Alle Proben der 7 Versuchstiere weisen 2 Populationen von Lymphocyten auf (Tab.1), der verwendete Puffer spielte dabei keine Rolle.



Abb.16: Volumenverteilung von Rattenlymphocyten aus der Lympe des Ductus thoracicus

I: Population mit dem kleineren Volumen von $141,0 \pm 27,5 \mu^3$

II: Population mit dem größeren Volumen von $196,0 \pm 23,9 \mu^3$

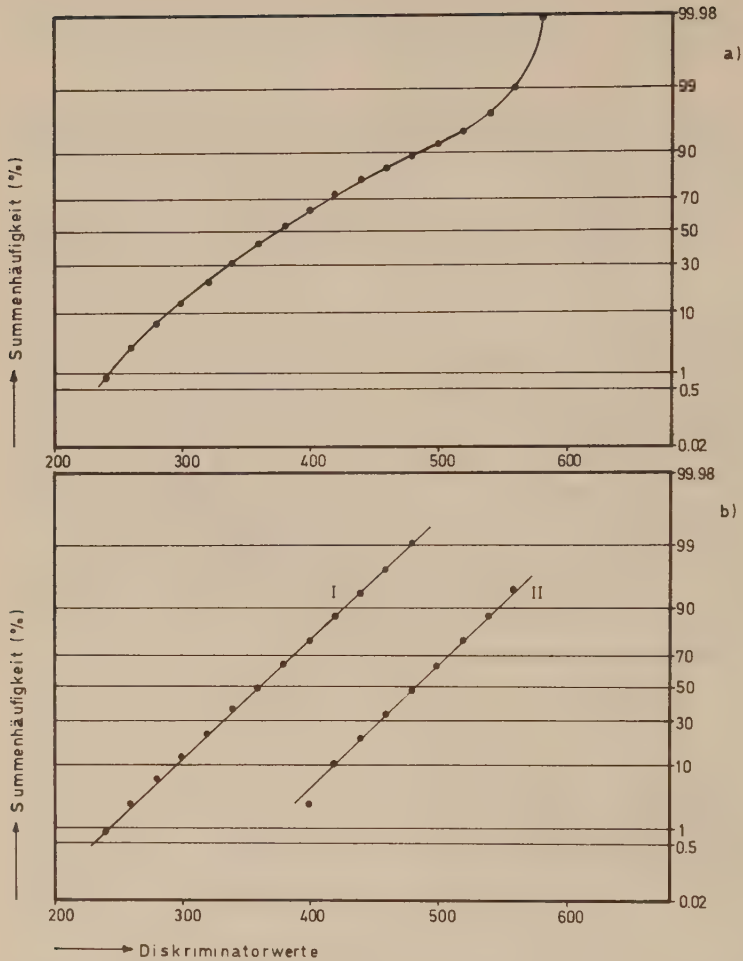


Abb.17: Prüfung der Kurven aus Abb.16 im Wahrscheinlichkeitsnetz auf GAUSSsche Normalverteilung

- a) Die ursprüngliche Kurve hat Mischpopulationscharakter
- b) Die Teilkurven I und II zeigen Normalverteilungen

Probe Nr.	Puffer	1.Population		2.Population	
		Volumen μ^3 Mittelwert	% aller Zellen	Volumen μ^3 Mittelwert	% aller Zellen
1	Michaelis	135	83	192	17
2	Michaelis	135	78	198	22
3	Michaelis	139	79	194	21
4	physiol.NaCl	141	80	189	20
5	Oulie	145	79	204	21
6	Oulie	144	80	196	20
7	Oulie	146	76	198	24

Tab.1: Volumenverteilung der Lymphocyten aus normaler Rattenlymphe

Als Mittel für die kleinere Population ergibt sich ein Volumen von $141,0 \pm 27,5 \mu^3$, während für die 2. Population ein Durchschnittsvolumen von $196,0 \pm 23,9 \mu^3$ errechnet wurde. Diese Werte entsprechen Zelldurchmessern von $6,5 \mu$ und $7,2 \mu$, wenn man die Lymphocyten als kugelige Zellen betrachtet.

Die Lymphocyten der normalen Lymphpe gehören demnach im Durchschnitt zu 79 % der kleineren und zu 21 % der größeren Fraktion an.

Zur Frage, wie sich eine Röntgenbestrahlung von 800 R in vitro (α) und in vivo (β) auf das Volumen der Ductus-lymphocyten auswirkt, wurden folgende Versuche gemacht:

α) Die Lymphpe von 5 Ratten wurde einer in vitro Bestrahlung von 800 R unterzogen. Die anschließende Untersuchung der bestrahlten Proben zeigte keine Volumenverschiebung im Vergleich zu den unbestrahlten Proben der gleichen Tiere (Abb.18).

β) Nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R wurde 10 Ratten der Ductus drainiert und von jedem Tier bis 1 1/2 Stunden nach der Bestrahlung die Lymphpe gesammelt. Bis zu diesem Zeitpunkt finden sich bei zellelektrophoretischen Untersuchungen fast ausschließlich schnelle Lymphocyten (Typ B) in der Lymphpe (siehe A 5). Falls dieser Typ B mit den kleineren Zellen ($V = 141 \mu^3$)

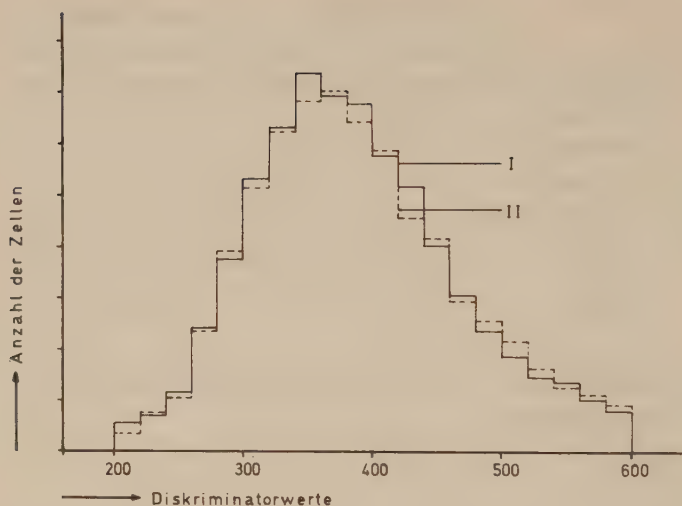


Abb.18: Volumenverteilung von Rattenlymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus nach einer in vitro Bestrahlung mit 800 R

I : nach einer in vitro Bestrahlung mit 800 R

II : unbestrahlte Kontrollmessung

identisch ist, wie es nach dem gleichen prozentualen Vorkommen in der normalen Lymphe den Anschein hat, müßte das Histogramm der Volumenmessung nach einer in vitro Bestrahlung eine einfache Gauß'sche Verteilung darstellen. Bei Prüfung der einzelnen Histogramme im Wahrscheinlichkeitsnetz zeigte es sich jedoch, daß diese Erwartung nicht von allen Tieren in vollem Maße erfüllt wurde (Abb.19). Nur bei etwa der Hälfte der Versuche gehören die gemessenen Zellen einer einzigen Population an, was durch eine gerade Linie gekennzeichnet ist. Die anderen Kurven zeigen noch einen gewissen Mischverteilungscharakter. Bei allen 10 Proben wurde aber neben der Volumenbestimmung auch eine zellelektrophoretische Untersuchung ausgeführt und dabei gefun-

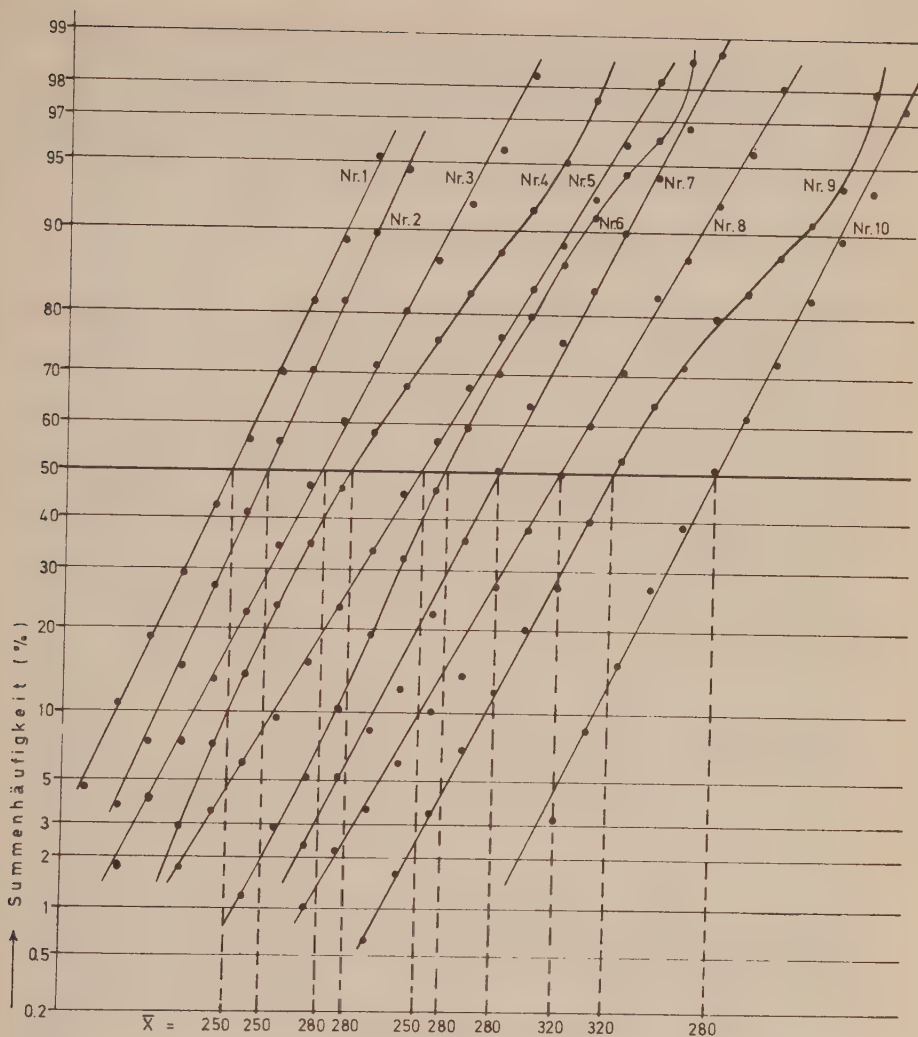


Abb.19: Prüfung der Histogramme von Ductus-Lymphocyten Ganzkörperbestrahlter Ratten (Nr.1-10) im Wahrscheinlichkeitsnetz auf GAUSSsche Normalverteilungen (Geraden) Der Abstand zwischen zwei Meßpunkten jeder Kurve beträgt 20 Diskriminator-Einheiten im GUTMANN-Gerät. Die Anordnung der Abszissenwerte ist variabel, angegeben ist für jede Kurve der 50 % - Wert.

den, daß die Proben No 4, No 6 und No 9, die volumenmäßig nicht einheitlich waren, auch hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit deutlich 2 Populationen aufwiesen. Wahrscheinlich wäre bei diesen Tieren zu einem späteren Zeitpunkt der Lymphabnahme mit beiden Methoden nur eine Population zu messen gewesen.

b) Messungen an Fattenblut-Leukocyten

Volumenmessungen an Rattenblut sollten zeigen, ob Beziehungen zwischen den Lymphocyten des Ductus thoracicus und des Blutes hinsichtlich des Volumens zu finden sind. Dafür wurden 10 Blute untersucht. Als Suspensionsmedium wurde Oulie- oder Michaelis-Puffer verwendet. 50 ml Blut-Puffer-Suspension wurden zur Zerstörung der Erythrocyten mit 0,2 ml 2 %igem Saponin von COULTER versetzt und nach 10 minütigem Stehenlassen gemessen. Bei allen Proben fand sich ein Maximum bei $105 \mu^3$ (Abb.20), auch bei Bluten, bei denen mittels Dextransenkung die Lymphocyten angereichert worden waren. Da in diesem Meßbereich keine Granulocyten erfaßt werden, muß es sich demzufolge um Lymphocyten handeln. Da jedoch eine Population mit so kleinem Volumen nicht in der Lymphe vorkommt, wurde zur Kontrolle auch Lymphe vor der Messung mit der gleichen Menge Saponin versetzt. Diese Versuche wurden an 6 Lymphproben durchgeführt. Es zeigte sich, daß sich auch bei einer solchen reinen Lymphocytensuspension nach Zugabe des Saponins das Maximum zu kleineren Volumina hin verschiebt. Nach etwa 10 Minuten tritt bereits der Maximaleffekt auf; im Durchschnitt findet sich eine Verschiebung von $141 \mu^3$ nach $106 \mu^3$. Abb.21 zeigt ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe. Das Histogramm ist ebenfalls eine rechtsschiefe Kurve, wobei die Population mit dem kleineren Volumen ($106 \mu^3$) den Hauptteil ausmacht und genau dem Gipfel entspricht, der im Blut gefunden wird. Die Population mit dem größeren Volumen liegt nach Saponinwirkung in der Lymphe bei $147 \mu^3$; es könnte sich dabei um unzerstörte Lymphocyten handeln.

Da man annehmen kann, daß durch Saponin die Zellmembran für die elektrischen Feldlinien durchlässig gemacht wird, und man dann nur noch das Volumen der Lymphocytenkerne mißt, wurde zur Fixierung der Zellmembran bei 5 Proben für 10 Minuten 5 %o Formalin

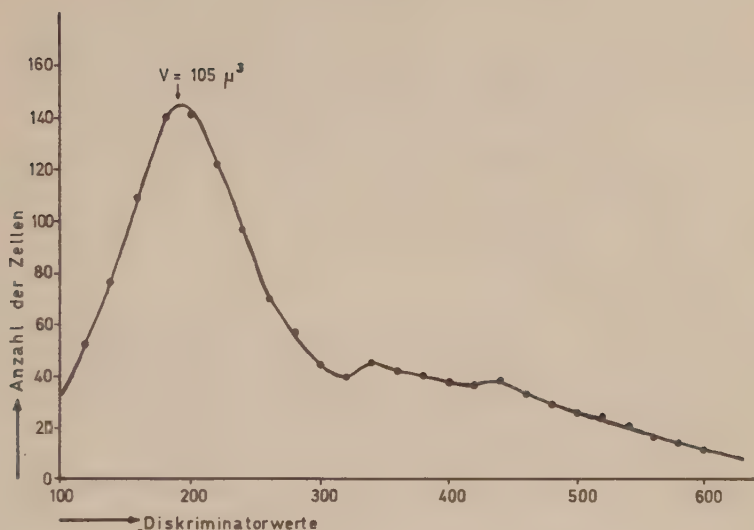


Abb.20: Volumenverteilung von Rattenblut-Leukocyten in Michaelis-Puffer nach Saponinzugabe

zugegeben. Nach anschließender Saponinzugabe zeigte sich jedoch das gleiche Ergebnis wie ohne Formalin. Formalin allein in gleicher Konzentration hatte keinen Einfluß auf das elektro-nisch gemessene Volumen.

2. Inkubation von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus der normalen Ratte in homologem Rattenplasma

Wie gezeigt werden konnte, besteht die Lymphe einer normalen Ratte zellelektrophoretisch aus 2 Populationen, wobei die eine die Beweglichkeit von $1,06 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}$ und die

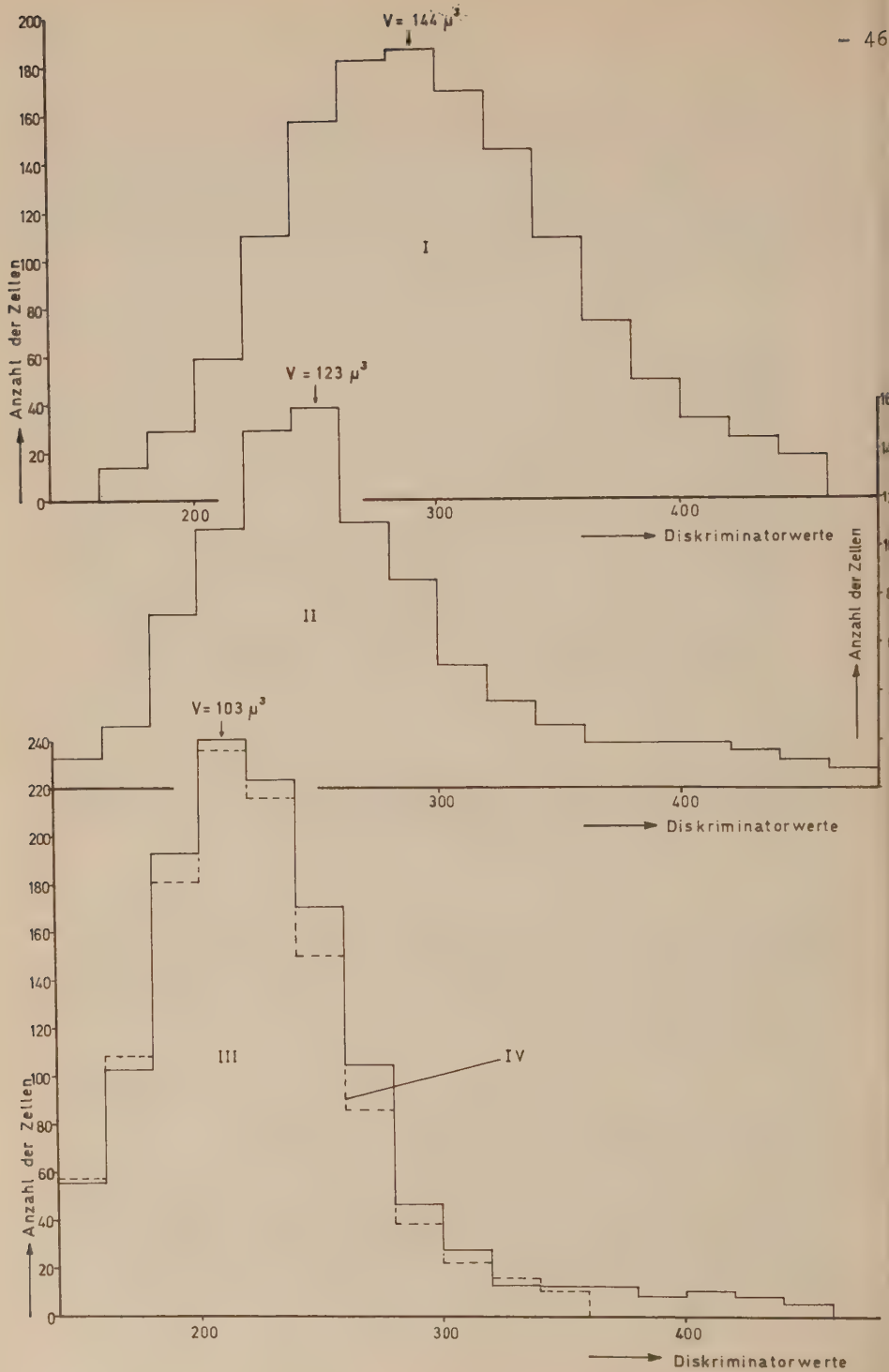


Abb.21: Volumenverteilung von Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus in Michaelis-Puffer (pH 6,9) vor und nach Saponinzugabe

- I: vor Saponinzugabe
- II: 2 Minuten nach Saponinzugabe
- III: 12 Minuten nach Saponinzugabe
- IV: 22 Minuten nach Saponinzugabe

andere von $0,93 \times 10^{-4} / \text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}$ hat. Obwohl durch die Einmündung des Ductus thoracicus in den linken Venenwinkel auch alle zellulären Bestandteile der Lymphe ins Blut gelangen, findet sich im Blut der normalen Ratte fast ausschließlich die langsamere Fraktion der Lymphocyten. Es stellt sich deshalb die Frage, was aus den schneller beweglichen Lymphocyten wird. Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß durch einen Bestandteil des Blutplasmas die elektrische Oberflächenladung der Lymphocyten verändert wird. Aus diesem Grunde wurde die Lymphe von 5 normalen Ratten in je 3 ml Plasma einer Ratte vom gleichen Stamm über eine Stunde hinweg gesammelt und anschließend für 2-5 Stunden im Wasserbad von 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lymphe für die Kontrollen stammte von den gleichen Tieren; sie wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen und sofort untersucht. Die Versuchsproben zeigten bei der zellelektrophoretischen Messung keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen.

3. Markierungsversuche an Rattenlymphocyten

Mit dem vorhergehenden Versuch wurde eine unmittelbare Veränderung der Oberfläche der Lymphocyten vom Typ B durch Plasmafaktoren ausgeschlossen. Eine andere Erklärung bot eine Arbeit von GOWANS u. KNIGHT (1964) an.

Die Autoren konnten an der Ratte durch Markierungsversuche zeigen, daß Lymphocyten rezirkulieren, d.h. die Lymphocyten,

die durch den ductus thoracicus ins Blut gelangen, können von dort aus wieder über die Lymphknoten in den Ductus kommen. Die Lymphocyten durchdringen dabei das Endothel der postkapillaren Venolen eines Lymphknotens und gelangen so in den Vas efferens. Ins Blut transfundierte Zellen erscheinen 2 Stunden später im Ductus, befinden sich aber bereits 15 Minuten später schon in den Endothelzellen. Für diese Versuche verwendeten die Autoren markierte Lymphocyten aus dem Ductus normaler Ratten. Die Ergebnisse von GOWANS u.KNIGHT lassen 2 Populationen vermuten, und zwar eine, die rasch zirkuliert und schnell durch Ductusdrainage abgezogen werden kann und eine andere, die langsam aber konstant zirkuliert und auch nach 5 Tagen Drainage immer noch ca 20 % des Ausgangswertes der Lymphocyten im Ductus aufrecht erhält. Es war naheliegend, die 2 Lymphocytenarten von GOWANS u.KNIGHT mit den zellelektrophoretisch und volumenmäßig gefundenen beiden Fraktionen zu identifizieren.

Aus diesem Grunde wurden zellelektrophoretisch einheitliche Lymphocytensuspensionen in vitro mit H^3 -Adenosin markiert und Tieren des gleichen Rattenstammes unter Narkose in die Vena femoralis injiziert. 24 Stunden später wurde die Verteilung der markierten Lymphocyten in der Empfängerratte durch autoradiographische Untersuchungen an Organausstrichen festgestellt. Bei den Ausführungen der Experimente wurden die Arbeitsbedingungen von GOWANS u.KNIGHT (1964) eingehalten.

Die vergleichenden Untersuchungen an den Organen der Empfängertiere erfolgte 24 Stunden nach Transfusion der markierten Lymphocyten, da die oben erwähnten Autoren zeigen konnten, daß zu diesem Zeitpunkt eine gute Durchmischung der Spenderlymphocyten mit denen des Empfängertieres stattgefunden hat. Bei einem kürzeren Zeitintervall ist dies nicht der Fall und die Möglichkeit, daß ein Teil der transfundierten Zellen noch von den Lungenkapillaren abgehalten wird, ist sehr groß. Das geschieht besonders leicht, wenn man zu schnell injiziert. Aus diesem Grunde wurden auch Tupfpräparate von den Lungen der Empfängerratten angefertigt. Sie zeigten keine markierten Zellen, und einzelne unmarkierte Lymphocyten fanden sich nur dort, wo das Vorhandensein vieler Erythrocyten auf Blut hindeutete. Einen späteren

Zeitpunkt als 24 Stunden zu wählen, wäre auch nicht günstig gewesen, da die radioaktive Markierung, wenn auch sehr langsam, so doch zeitabhängig immer mehr verloren geht (GOWANS u. KNIGHT).

Nach 1-stündiger Inkubation mit H^3 -Adenosin waren im Durchschnitt markiert:

- a) von den Blutlymphocyten (Typ A) : 42 %
- b) von den Lymphocyten aus der normalen Lymphe (Typ A u.B):
50 %
- c) von den Lymphocyten aus der Lymphe bestrahlter Ratten
(Typ B) : 92 %

Diese Werte sind das Mittel aus jeweils 2 Versuchstieren, die keine großen Abweichungen untereinander zeigten.

Tab.2 zeigt die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen. Es gelang nicht, die markierten Lymphocyten vom Typ B in den untersuchten Organen des Empfängertieres wiederzufinden. Ob das an der um etwa eine Größenordnung geringeren Zahl an injizierten Zellen lag - es wurden $1,44 \times 10^8$ Zellen vom Typ A, aber nur $2,1 \times 10^7$ Zellen vom Typ B gespritzt - oder ob diese Zellen schneller abgebaut werden, kann nicht beurteilt werden. Aus technischen Gründen konnte die Zahl an reinen B-Lymphocyten nicht vergrößert werden. Bei den Versuchen wurde nämlich schon die Lymphe von 3-4 bestrahlten Ratten vereinigt; die Lymphocytenzahl im Ductus lymphaticus sinkt nach Bestrahlung stark ab und die Zeit des Sammelns muß auf etwa 2 Stunden nach der Bestrahlung beschränkt bleiben, da zu einem späteren Zeitpunkt neben Typ B wieder Lymphocyten vom Typ A auftreten (Ergebnisse A.5).

Daß es sich bei diesen Lymphocyten vom Typ B jedoch um eine gesunde Population und nicht um Abbaustufen handelt, zeigt die Tatsache, daß ca 92 % der Zellen H^3 -Adenosin eingebaut haben, was für einen regen Stoffwechsel spricht.

Vergleiche über die Verteilung der markierten Lymphocyten konnten also nur zwischen Zellen des Typs A und einem Lymphocyten-genisch der normalen Lymphe (20 % Typ A, 80 % Typ B) angestellt werden. Während sich die markierten Lymphocyten vom Typ A durch-

Empfänger- Ratte Nr.	Art der Lymphocyten- suspension	Anzahl der inj. Lymphocyten ($\times 10^7$)	Prozentsatz markierte Lymphocyten im Empfänger (500-1000 gezählte Zellen)					
			gesamt markiert	Lymphknoten	Blut	Milz	Thymus	Knochenmark
			%	%	%	%	%	%
				Hals	Bauch			
				%	%			
I	A	31,8	12,7	4,0	4,0	-	1,0	1,4
VI	A	36,0	16,2	3,1	4,0	2,0	1,2	1,0
VII	20 % A + 80 % B	18,9	11,0	5,0	1,0	1,0	1,0	2,0
II	20 % A + 80 % B	18,0	9,0	4,5	3,1	-	1,0	2,0
III	B	2,8	2,8	-	-	-	-	-
X	B	1,6	1,4	-	-	-	-	-

Tab. 2: Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen

schnittlich zu 3,5 % in der Lymphe und zu 4 % im Blut fanden, wurden von dem markierten Lymphocytenmisch aus der Lymphe durchschnittlich 2,0 % und in der Lymphe des Empfängertieres 4,7 % wiedergefunden. In den Ausstrichen von Thymus und Knochenmark konnten bis auf 1-2 fragliche Zellen keine markierten Lymphocyten nachgewiesen werden.

4. Zellelektrophoretische Untersuchungen bei der Immunisierung von Mäusen

Um zu prüfen, ob Immunolymphocyten eine andere elektrophoretische Beweglichkeit haben als normale Lymphocyten, wurden 75 Mäuse gegen menschliche Erythrocyten der Blutgruppe 0 immunisiert. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere ca 13 Wochen alt. Sie erhielten 4 mal im Abstand von 3-4 Tagen eine i.p. Injektion von 0,05 ml gepackten und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Erythrocyten und eine 5. Injektion des gleichen Antigens am 36. Tag nach Versuchsbeginn. Der Antikörpertiter im Serum der Tiere wurde zweimal in der Woche mittels eines Agglutinationstestes ermittelt. Er stieg innerhalb von 4 Wochen bis zu 1:1280 an und fiel dann langsam wieder ab. Die 5. Injektion löste die sog. Sekundärreaktion (secondary response) aus: Der Antikörpertiter stieg steil an bis zu den Werten 1:6400. 2 Wochen danach war der Titer wieder negativ. Die Blute der Kontrolltiere waren immer negativ.

Die Zellen der Milz und des Thymus von je 3 Versuchstieren und 1 Kontrolltier wurden zellelektrophoretisch zweimal in der Woche untersucht.

Die Milzen der nicht immunisierten Kontrolltiere zeigten 3 Zellfraktionen:

1. Zellen mit der Beweglichkeit der Blutgranulocyten
2. Zellen mit der Beweglichkeit der Blutlymphocyten (Typ A)
3. Zellen mit der Beweglichkeit der schnellen Zellen (Typ B)

Die Milz einer normalen Maus zeigt somit zellelektrophoretisch die gleichen Fraktionen wie sie in der Rattenmilz gefunden wurden (Ergebnisse A 7). Bei den Milzen von ca 3/4 der immunisierten Versuchsmäuse fand sich jedoch neben diesen 3 Zelltypen

noch ein vierter, welcher eine noch geringere Beweglichkeit als die Granulocyten aufwies. Das Auftreten dieses 4. Zelltyps, der der Beweglichkeit nach einer Zellfraktion aus dem Thymus gleicht, war jedoch nicht einheitlich. Er fand sich bei den einzelnen Mäusen mehr oder weniger häufig und wurde einmal auch bei einem Kontrolltier angetroffen. Es ist deshalb nicht sicher, ob diese Zellart eine Folge der Immunisierungsreaktion ist.

Die Zellen aus den Thymi der Versuchstiere zeigten auch bei hohem Antikörpertiter keine Veränderungen gegenüber der Kontrolltiere.

5. Untersuchung der einzelnen Lymphocytenfraktionen auf ihre Fähigkeit zur Antikörperbildung mithilfe des Plaque-Testes nach JERNE

Männliche Sprague-Dawley Ratten von ca 200 g Gewicht wurden mit 0,5 ml einer i.p. verabreichten 25 %igen Schaferythrocyten-Suspension immunisiert. Das frische Schafblut wurde mit ALSEVER'scher Lösung 1:2 verdünnt aufbewahrt und vor der Injektion wurden die Erythrocyten 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. 4 Tage nach der Injektion wurden die verschiedenen Lymphocytenfraktionen dieser Tiere mittels des Plaque-Testes nach JERNE u. NORDIN (1963) auf ihre Fähigkeit hin, Antikörper zu bilden, untersucht.

Eine Lymphocytenanreicherung aus dem Blut wurde mittels Schräg-senkung nach Dextranzugabe und die Lymphocyten aus der Lymphe durch Ductusdrainage gewonnen. Die Zellen wurden jeweils abzentrifugiert, einmal mit einer großen Menge physiologischer Kochsalzlösung oder mit einem physiologischem Kulturmedium gewaschen und dann wieder in einer der beiden Lösungen resuspendiert. Ein gründliches Auswaschen der Zellen ist erforderlich, da Blut- und Lymphflüssigkeit einen Antikörpertiter von etwa 1:8000 besitzen. Dieser Titer wurde mit der gleichen Methode bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

a) von 5 Bluten immunisierter Ratten, deren Lymphocytenkonzentration durch Leukocytenzählung und anschließende Differenzierung

bestimmt wurde, war im Durchschnitt jede 320 ± 187 . Zelle Antikörper-bildend.

b) Von Lymphocyten aus der Lymphe von 6 immunisierten Ratten war im Durchschnitt jede 9200 ± 4200 . Zelle Antikörper-bildend.

c) Von Lymphocyten aus der Lymphe von 5 immunisierten und unmittelbar vor der Ductusdrainage bestrahlten Ratten war jede 61000 ± 45000 . Zelle Antikörper-bildend.

In allen 3 Gruppen handelt es sich um kleine Plaques mit unscharfem und ausgefranstem Rand. Die Lyse geht meistens von Einzelzellen aus, es finden sich mitunter jedoch auch Zellklumpen inmitten eines Plaques. Die Plaque-Technik schließt viele Fehlermöglichkeiten ein, zumal bei dem hier untersuchten Material nicht in jedem Fall Einzelzellen erhalten werden konnten. Trotzdem kann man sagen, daß elektrophoretisch normal bewegliche Blutlymphocyten, die sich auch zu 20 % in der Rattenlymphe befinden, nach einer Immunisierung mit Schaferythrocyten durchschnittlich zu 3 % Antikörper gegen dieses Antigen bilden können. Auf Grund einer PAPPENHEIM-Färbung ließ sich ausschließen, daß es sich bei diesen Zellen um Plasmazellen handelt. Die Lymphocyten der normalen Rattenlymphe, die nur zu 20 % aus diesem Zelltyp bestehen, haben einen viel geringeren Titer: Nur 0,1-0,2 % dieser Lymphocyten haben hier Antikörper gebildet. Werden die immunisierten Tiere vor der Lymphocytenengewinnung mit 800 R bestrahlt, was zu einem fast völligen Verschwinden der elektrophoretisch normal beweglichen Lymphocyten in der Lymphe führt, ist durchschnittlich nur noch jede 61000. Zelle Antikörper-bildend, d.h. 0,02 % aller Lymphocyten.

IV. B e s p r e c h u n g

Im Verlauf der Phylogenese finden sich die Lymphocyten schon bei den primitiven Fischen. Die Entwicklung eines lymphatischen Apparates geht hier parallel mit der Ausbildung immunologischer Reaktionen. Bei den Vögeln machten GOOD et al. (1966) das Vorhandensein zweier verschiedener immunologischer Systeme wahrscheinlich. Davon ist das Thymussystem für die Entwicklung der zellulären Immunität verantwortlich, während das System der Bursa Fabricii, ein lymphoepitheliales Organ des Enddarmes, die Bildung der humoralen Antikörper kontrolliert. Beim Menschen bestehen Anhaltspunkte für eine analoge Teilung: Die Funktion des Thymus soll jener der Vögel gleichen, während das der Bursa entsprechende Organ in den Lymphdrüsen gesehen wird; besondere Bedeutung kommt dabei den Peyer'schen Plaques zu (GOOD et al., 1966).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der Frage der morphologischen und funktionellen Einheitlichkeit der kleinen Lymphocyten.

Die individuelle Entwicklung eines Lymphocyten geht vermutlich von einer primitiven Reticulumzelle aus. Über 6-8 Mitosen (GRUNDMANN, 1958; SAINTE-MARIE u. LEBLOND, 1958), während derer sich zuerst ein intensiv basophil gefärbtes Cytoplasma entwickelt und dann wieder verschwindet, entsteht der kleine Lymphocyt (Übersicht: JOFFEY, 1962). Diese Zelle ist die kleinste des Körpers. Sie zeigt in einem nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich einen kompakten violetten Kern und einen ganz schmalen Cytoplasmasaum. Der geringe Plasmarand enthält nur wenige Strukturen, darunter Ribosomen und Mitochondrien, jedoch fast kein endoplasmatisches Reticulum (Übersicht: HITZIG, 1965).

Etwa 97 % aller Zellen der normalen Rattenlymphe gehören zu den kleinen Lymphocyten, während die restlichen 3 % größere Zellen mit einem breiten Cytoplasmarand darstellen, wovon die meisten zu den sog. großen Lymphocyten gehören. Das Zahlenverhältnis dieser beiden Gruppen ist bei den verschiedenen Säugern unter-

schiedlich (CRONKITE et al., 1959; EVERETT et al., 1959; GOWANS et al., 1959), deshalb lassen sich meine an der Ratte gefundenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Tiere übertragen.

Mit der Zellelektrophorese und auch mittels der elektronischen Volumenmessung nach GUTMANN konnten die morphologisch einheitlichen kleinen Lymphocyten aus der Lymphe des Ductus thoracicus der Ratte in zwei Populationen unterteilt werden. Die zellelektrophoretischen Messungen ergaben dabei, daß 23 % der Lymphocyten eine elektrophoretische Beweglichkeit von $0,930 \pm 0,050 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ besitzen - sie wurden als Typ A bezeichnet -, während die restlichen 77 % eine elektrophoretische Beweglichkeit von $1,060 \pm 0,066 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{]}$ haben; diese Zellen erhielten die Bezeichnung Typ B. Durch die Volumenbestimmung konnte 79 % der Zellen ein mittleres Volumen von $141,0 \pm 27,5 \mu^3$ und 21 % der Zellen ein Volumen von $196,0 \pm 23,9 \mu^3$ zugewiesen werden. Diesen Volumenwerten entsprechen Zelldurchmesser von $6,5 \mu$ und $7,2 \mu$, wenn man annimmt, daß die Lymphocyten kugelige Zellen sind. Der geringe Unterschied zwischen den beiden mittleren Zelldurchmessern macht es verständlich, daß man bisher die Existenz zweier Populationen innerhalb der kleinen Lymphocyten übersehen hat. Sie konnten nur durch eine statistische Analyse entdeckt werden.

Bei Gegenüberstellung dieser Ergebnisse liegt es nahe, die Zellen mit dem größeren Volumen mit den elektrophoretisch langsameren Lymphocyten und diejenigen mit dem kleineren Volumen mit der schneller beweglichen Fraktion zu identifizieren. Diese Annahme wird nicht nur durch die fast gleichen Zahlenverhältnisse gestützt, die in der normalen Rattenlymphe gefunden werden, sondern auch durch die Verschiebung dieser Werte unter unphysiologischen Bedingungen. So finden sich nach einer Röntgenganzkörperbestrahlung mit 800 R in der Lymphe von Ratten, die zellelektrophoretisch nur noch die schnelleren Lymphocyten enthalten, auch nur noch die Lymphocyten mit dem kleineren Volumen.

Im Blut liegen andere Verhältnisse vor: Es finden sich hier fast ausschließlich Lymphocyten des Typs A und nur gelegentlich findet man beim gesunden Tier bis höchstens 5 % elektrophoretisch schnelle Zellen (ARNOLD, 1964). Eine genaue Volumenmessung der

Leukocyten des peripheren Rattenblutes scheiterte aus methodischen Gründen. Um nämlich eine einigermaßen reine Leukocyten-suspension aus dem Blut zu erhalten, muß dieses mit Saponin vorbehandelt werden. Dadurch wird die große Überzahl an Erythrocyten zerstört. Vergleichsmessungen an Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus zeigten aber, daß die Saponinzugabe auch die Lymphocyten schädigt, so daß die Volumenmessung zu einem wesentlich geringeren Wert führt. Vermutlich wird die Leukocytenmembran durch Saponin so verändert, daß sie für die elektrischen Feldlinien durchlässig wird und die Messung nicht das Volumen der Gesamtzelle, sondern lediglich dasjenige der Zellkerne angibt.

Es ist überraschend, daß im normalen Rattenblut fast ausschließlich Lymphocyten des Typs A zu finden sind, da die durch den Ductus thoracicus dauernd ins Blut eingeschleusten Lymphocyten zu 4/5 aus Typ B bestehen. Die nächstliegende Erklärung, daß durch spezifische Plasmafaktoren Lymphocyten des Typs B so verändert werden, daß sie die Beweglichkeit des Typs A annehmen, wurde durch in vitro Inkubationsversuche ausgeschlossen: Die Beweglichkeit der untersuchten Zellen änderte sich dabei nicht.

Eine andere Deutung besteht in der Annahme, daß B-Lymphocyten das Blut sehr viel schneller wieder verlassen als A-Lymphocyten.

Die gewonnenen Daten ermöglichen eine Überschlagsrechnung der normalen Verweildauer der A- und B-Lymphocyten im Blut der Ratte. Dabei wird folgendes vorausgesetzt:

1. Dem Blut einer 200 g schweren Ratte fließen über den Ductus thoracicus ca 2×10^7 Lymphocyten in der Stunde zu (REINHARDT, 1964).
2. Eine Ratte von 200 g Gewicht hat ca 10 ml Blut.
3. Die Gesamtleukocytenzahl des peripheren Blutes beträgt $10000/\text{mm}^3$, wovon 80 % den Lymphocyten angehören.

Die zellelektrophoretischen Untersuchungen ergeben unter diesen Voraussetzungen, daß im Blut $7,76 \times 10^7$ (= 97 %) A-Lymphocyten und $0,24 \times 10^7$ (= 3 %) B-Lymphocyten vorhanden sind. Durch den

Zufluß der Ductus-Lymphocyten gelangen in der Stunde $0,4 \times 10^7$ Zellen des Typs A und $1,6 \times 10^7$ Zellen des Typs B ins Blut. Aus diesen Werten ergibt sich für die A-Lymphocyten eine mittlere Verweildauer im Blut von ca 19 Stunden, während sie für die B-Lymphocyten nur ca 9 Minuten beträgt.

Dies steht mit Ergebnissen von Gowans und Knight (1964) in guter Übereinstimmung. GOWANS u. KNIGHT (1964) haben mittels Markierungsversuche gezeigt, daß die Lymphocyten des Ductus thoracicus rezirkulieren: Die Zellen, die aus dem Ductus thoracicus ins Blut gelangen, wandern von dort aus wieder über die Lymphknoten in den Ductus. Die Lymphocyten durchdringen dabei das Endothel der postkapillaren Venolen der Lymphknoten und gelangen so in dessen Vasa efferentia. Diese Rezirkulation geht mindestens zum Teil sehr schnell vor sich, so daß ins Blut transfundierte markierte Lymphocyten sich bereits 15 Minuten später in den Endothelzellen finden (MARCHESI u. GOWANS, 1964). GOWANS und KNIGHT fanden nun, daß ca 80 % der kleinen Lymphocyten schnell rezirkulieren, so daß diese Zellen durch eine länger dauernde Ductusdrainage in relativ kurzer Zeit weitgehend entfernt werden können. Die restlichen 20 % zirkulieren dagegen langsamer aber konstant und geben auch noch nach einer 5 Tage dauernden Drainage konstante Lymphocytenwerte im Ductus.

Die Übereinstimmung in den Prozentsätzen zwischen den langsam rezirkulierenden 20 % und den schnell zirkulierenden 80 % einerseits, und den Prozentsätzen der Typen A und B andererseits, legt eine Zusammengehörigkeit der beiden Befunde nahe. Versuche, diese Annahme auch durch Markierungsexperimente zu beweisen, waren allerdings aus methodischen Gründen nur teilweise erfolgreich. Es erwies sich nämlich als unmöglich, eine für einen solchen Versuch genügend große Anzahl von markierten einheitlichen B-Lymphocyten aus der Ductuslymphe Ganzkörper-bestrahlter Ratten zu gewinnen; das Maximum von $2,8 \times 10^7$ markierten Lymphocyten des Typs B war nicht ausreichend, um 24 Stunden später diese Zellen im Empfänger tier wiederzufinden.

H^3 -Thymidin, welches spezifisch in die DNA der Zellen eingebaut wird, wäre für die hier beschriebene Art von Versuchen das ideale Markierungsmittel gewesen, da es nur durch Zelltod oder

Zellvermehrung verloren gehen kann. Da aber bekannt ist, daß Ductus-Lymphocyten nur schwer in vivo (CRONKITE, 1960; GOWANS et al., 1961; LITTLE et al., 1962; CAFFREY et al., 1962) und überhaupt nicht in vitro H^3 -Thymin einbauen, wurde mit H^3 -Adenosin markiert. HARRIES (1959) und WATTS und HARRIES (1959) konnten jedoch zeigen, daß auch eine in vitro Markierung mit H^3 -Adenosin zufriedenstellende Ergebnisse zeigt, wenn das Schicksal der markierten Zellen nur über einen relativ kurzen Zeitraum hinweg verfolgt werden soll. H^3 -Adenosin markierte unter den Bedingungen der vorliegenden Versuche hauptsächlich die Kern-RNA der Lymphocyten. Dabei scheint die Radioaktivität der transfundierten Lymphocyten geringer zu sein als die der wiedergewonnenen Zellen aus den Empfängertieren. Hierfür gibt HARRIES (1959) folgende Erklärung: Während der Inkubation von markierten Zellen in einem nicht-radioaktiven Medium wird aus einem Vorrat säurelöslicher Vorstufen RNA synthetisiert. Das Ergebnis ist ein Anstieg der Gesamtradioaktivität in der RNA. Der Aufenthalt der markierten Lymphocyten im Empfängertier kann als eine Inkubation angesehen werden.

Die Transfusion von markierten A-Lymphocyten oder einem Gemisch von A + B-Lymphocyten (20:80) ergab im Thymus 24 Stunden später keine markierten Zellen. Dies deutet darauf hin, daß der Thymus von der Rezirkulation der Lymphocyten ausgeschlossen ist. Zellelektrophoretisch enthält der Thymus der Ratte und der Maus keine B-Lymphocyten; es finden sich aber neben Zellen mit der Beweglichkeit von A-Lymphocyten noch zwei weitere Blöcke im Histogramm, wovon der eine die Beweglichkeit der Granulocyten und der andere eine noch langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als jene aufweist. Alle Fraktionen zeigten im nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich das Aussehen der Thymocyten: Es handelt sich um Zellen mit einem runden, violett gefärbten Kern und blauem Cytoplasma.

Die beiden Zellfraktionen, die neben den A-Lymphocyten im Thymus der Ratte und der Maus angetroffen werden, sind in keinem anderen lymphatischen Organ beim normalen Tier nachweisbar; die elektrophoretisch langsamste Zellgruppe findet sich jedoch in den Milzen von Ratten, die mit menschlichen Erythrocyten immunisiert worden waren. Da das Vorkommen dieser Zellart aber bei

den 39 Versuchstieren zwischen 5 und 35 % schwankte und diese Zellen auch bei einem der 10 Kontrolltiere angetroffen wurden, ist nicht sicher, ob ihr Auftreten in der Milz tatsächlich die Folge einer Immunisierungsreaktion ist.

Das Histogramm der normalen Milz und der Lymphknoten einer Ratte enthalten im Gegensatz zum Thymus Typ A und B der Lymphocyten.

Auch im Knochenmark konnten keine markierten Zellen nach einer Infusion gefunden werden. Zellelektrophoretisch wurden hier zwar Zellen mit der Wanderungsgeschwindigkeit der B-Lymphocyten gemessen, diese waren aber morphologisch deutlich im Cytopherometer von Lymphocyten unterscheidbar, da sie größer und grob granuliert waren. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von ALBERT et al.(1966), die zeigen, daß die lymphocytenähnlichen Zellen im Knochenmark der Maus nicht aus dem peripheren Blut stammen, sondern daß es sich bei ihnen wahrscheinlich um Erythrocytenvorstufen handelt.

Im Blut fanden sich nach der Injektion markierter A-Lymphocyten etwa 4 % markierte Zellen. Die Injektion markierter Ductus-Lymphocyten, d.h. eines Gemisches von 20 % A- und 80 % B-Lymphocyten, ergab im Blut eine Markierungsrate von etwa 2 % Lymphocyten. Dieser geringe Unterschied der Markierungsrate bei den 2 Versuchen ist überraschend, wenn man bedenkt, daß das Blut höchstens 5 % B-Lymphocyten enthält.

Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Gesamtzahl der A-Lymphocyten im Körper sehr viel größer ist, als jene der B-Lymphocyten und daß bei einer gleichmäßigen Verteilung der jeweils markierten Zellen die A-Lymphocyten im Blut keine wesentlich höhere Markierungsrate besitzen als die B-Zellen.

Der Unterschied könnte allerdings auch methodisch bedingt sein: Die für die Markierung verwendeten A-Lymphocyten wurden aus dem peripheren Blut durch Schrägsenkung nach Dextranzugabe und anschließendes Waschen gewonnen. Es ist möglich, daß diese Manipulation die A-Lymphocyten so schädigt, daß sie 24 Stunden später im Empfängertier nicht mehr in entsprechenden Prozentsätzen auftreten.

Die B-Lymphocyten dagegen, die aus der Lymphe des Ductus thoracicus stammen, werden keiner so schädigenden Prozedur unterworfen, so daß ihr Wiederfinden im Empfängertier vollzählig sein dürfte.

Aus diesen Gründen läßt sich aus den Zahlenwerten markierter Zellen im Blut bei den beiden Versuchen kein sicherer Schluß auf die Gesamtzahl der A- und B-Lymphocyten im Körper ziehen.

Die Leukocytenzahlen des peripheren Blutes nach einer Unterbindung des Ductus thoracicus zeigen, daß die Ductus-Lymphocyten zahlenmäßig nur zum Teil für den Nachschub der Lymphocyten des peripheren Blutes verantwortlich sind. Die Lymphocytenwerte der Versuchstiere fielen nach 3 Stunden auf 39 % des Ausgangswertes, die scheinoperierten Kontrolltiere zeigten jedoch ebenfalls einen Lymphocytensturz auf 49 % des Ausgangswertes, was wahrscheinlich als Stresseffekt aufgefaßt werden kann, der durch die Ausschüttung von Cortison hervorgerufen wird. Die Verminderung peripherer Lymphocyten nach Cortisongaben ist experimentell nachgewiesen (BASERGA u. MORSIANI, 1961; DOUGHERTY u. FRANK, 1953). Der Unterschied zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren ist nur gering, wenn man berücksichtigt, daß der Ductus thoracicus in der Stunde etwa 2×10^7 Zellen in das Blut abgibt (REINHARDT, 1964).

Nach verschiedenen Reizen treten auch im Blut neben den A-Lymphocyten B-Lymphocyten stark vermehrt auf. Dies gilt für akute Entzündungen beim Menschen (RUHENSTROTH - BAUER et al., 1961), für eine Ganzkörperbestrahlung bei der Ratte (GOSTOMZYK et al., 1963) und aufgrund der vorliegenden Untersuchungen auch für eine intravenöse oder intraperitoneale Äthanolinjektion. Sowohl eine Unterbindung des Ductus thoracicus als auch Splenektomie verhindert das Auftreten der B-Lymphocyten nach einer Ganzkörperbestrahlung der Ratte. Da NISIMARI (1965) zeigen konnte, daß auch für zelluläre Elemente eine Verbindung zwischen Milz und Ductus thoracicus besteht, ist die einfachste Deutung dieses Befundes die, daß die B-Lymphocyten nach diesen Reizen hauptsächlich aus der Milz stammen und durch Lymphgefäße in den Ductus thoracicus und von hier in das Blut gelangen.

Aus den Ergebnissen nach einer Äthanolinjektion bei a) splenektomierten und b) Tieren mit unterbundenem Ductus thoracicus,

geht andererseits hervor, daß auch weitere Organe in der Lage sein müssen, auf einen entsprechenden Reiz hin B-Lymphocyten vermehrt ins Blut abzugeben, da auch bei diesen Versuchen einzelne Tiere bis zu 15 % schnelle Lymphocyten im Blut aufzeigten. Im gleichen Sinn sprechen frühere Untersuchungen (FEESER, 1966), bei denen Ratten 4 Wochen nach einer Milzex-tirpation B-Lymphocyten in ihrem Blut nach einer Ganzkörperbestrahlung aufwiesen: Auch hier gibt offenbar ein anderes Organ als die Milz B-Lymphocyten in den Kreislauf ab. Es ließen sich keine Anhaltspunkte dafür finden, daß in dieser Hinsicht Unterschiede zwischen den einzelnen regionalen Lymphknoten, z.B. zwischen Hals- und Bauchlymphknoten, bestehen. Die Angaben von GOSTOMZYK et. al. (1965), daß eine Fraktion aus normaler Milz das Auftreten von B-Lymphocyten 2 Stunden nach der Injektion in milznormalen sowie milzlosen Ratten herbeiführen kann, wäre eine Parallele zu dieser Wirkung einer Äthanolinjektion.

Unter verschiedenen Fragestellungen haben sich bereits zahlreiche Autoren mit der Wirkung von Röntgenstrahlen auf das lymphatische System beschäftigt (CRONKITE et. al., 1962; GIDALI u. FEHER, 1964; BARNES et. al., 1964; HAGEN, 1962). Alle haben eine Verminderung der peripheren Lymphocyten beobachtet. Der Mechanismus der Lymphopenie ist noch nicht genau erkannt, man nimmt aber an, daß die Strahlenschädigung zu einem Abfangen der Lymphocyten durch das RES führt (CRONKITE et. al., 1962). In der Ductuslymphe finden sich bei meinen Versuchen bis zu 2 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R nur noch Lymphocyten des Typs B. Diese Zellen sind besonders stoffwechselaktiv: Nach 1-stündiger Inkubation mit H^3 -Adenosin waren 92 % dieser Zellen markiert.

Die Strahlenwirkung scheint demnach hauptsächlich die Blutlymphocyten des Typs A zu treffen, die unter Zeichen von Karyolyse und Karyorrhexis (FLIEDNER et al., 1965) rapid aus dem Blut verschwinden, zumal ja, wie oben ausgeführt, der Nachschub der A-Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus nach einer Ganzkörperbestrahlung verringert ist, bzw. bei hohen Bestrahlungsdosen völlig fehlt.

Inwieweit meine Ergebnisse über die Wirkung einer Röntgen-Ganzkörperbestrahlung auf die Lymphocyten in Beziehung zu den morpho-

logischen Befunden von WAUBKE et al. (1967) stehen, läßt sich nicht beantworten.

Eine Alkoholinjektion führt im peripheren Blut zu einem ausgeprägten Lymphocytensturz. Unter Standardbedingungen fallen die Werte bei den Kontrolltieren, denen 0,4 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert worden war, auf durchschnittlich 87 % ihres Ausgangswertes ab; die Injektion eines Gemisches von 0,2 ml 96 %igem Äthanol und 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung ergibt dagegen einen Lymphocytensturz auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Der steilste Abfall deckt sich mit dem Auftreten der B-Lymphocyten im Blut: 15 Minuten nach der Alkoholinjektion machen die elektrophoretisch schnellen Lymphocyten etwa 35 % aller Leukocyten aus. Eine Stunde später sind diese Zellen wieder aus dem Blut verschwunden. Bei diesen Versuchen konnte ausgeschlossen werden, daß die Ganzkörperbestrahlung oder der Alkohol eine unmittelbare Wirkung auf die Membranladung der Lymphocyten ausübt: Weder eine entsprechende in vitro-Inkubation mit Alkohol noch eine in vitro Bestrahlung ergaben eine Veränderung des normalen Hämoctypherogramms und der normalen Lymphbefunde.

Ein Vergleich zwischen dem Cytopherogramm der Milz und dem des Blutes 10-15 Minuten nach der Alkoholinjektion spricht für die Übereinstimmung der Lymphocytenfraktionen (Abb.22). Auch morphologisch ließ sich kein Unterschied finden.

Neben den genannten morphologisch-strukturellen Unterschieden konnte auch ein funktioneller Unterschied zwischen den A- und den B-Lymphocyten mittels der Plaque-Technik nach JERNE erbracht werden: Nur die Fraktion der A-Lymphocyten enthält Zellen, die nach Injektion eines Antigens Antikörper gegen dasselbe bilden. Unter den beschriebenen Bedingungen erzeugten im Durchschnitt 3 % oder Blutlymphocyten, die fast ausschließlich dem Typ A angehören, Hämolysine gegen Schafer erythrocyten, die als antigener Reiz verwendet worden waren. Von den Zellen der normalen Lymphe, die zu 20 % A-Lymphocyten enthält, waren im Durchschnitt nur 0,1 % an der Antikörperbildung beteiligt. Wenn man die relativ große Streuung bei der Plaque-Technik berücksichtigt, kann man sagen, daß das Zahlenverhältnis Antikörperbildender Zellen zwischen Blut und Lymphe ungefähr ihrem prozentualen Anteil an A-Lymphocyten entspricht. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß

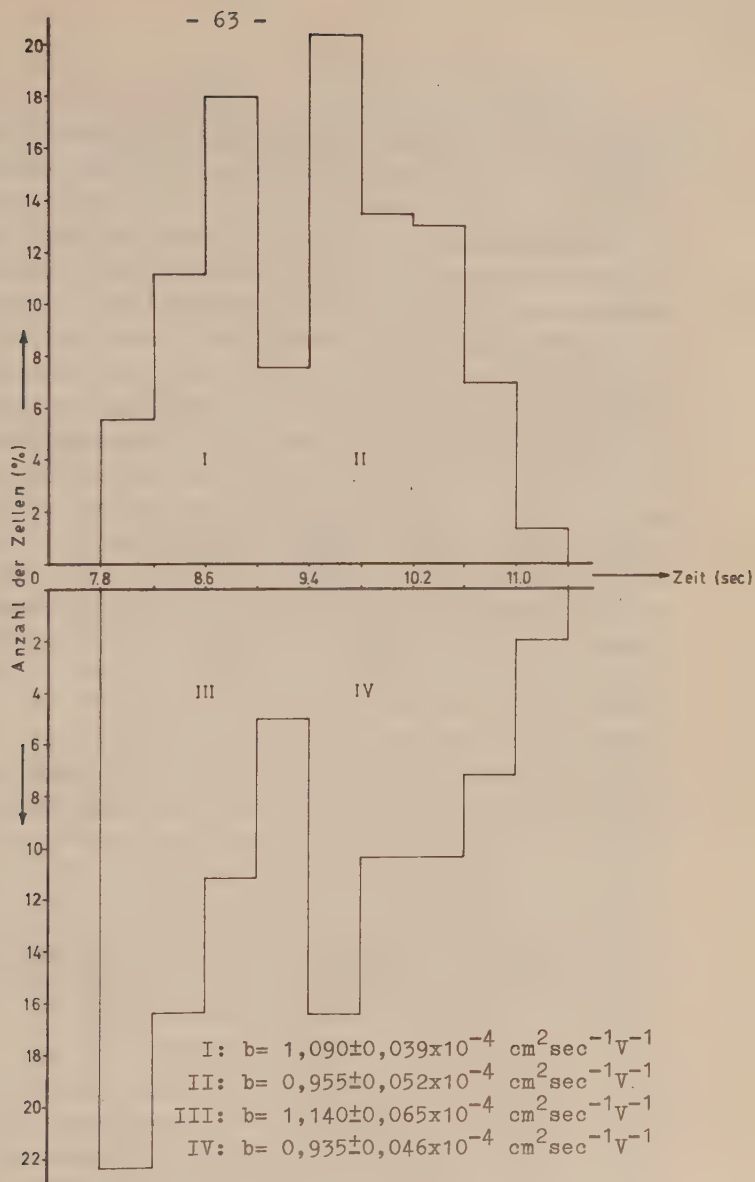


Abb.22: Das obere Cytopherogramm zeigt die Verteilung der Lymphocyten des Blutes 15 Minuten nach Alkoholinjektion, das untere gibt die Verteilung der lymphocytären Elemente in der Milz wieder.

die Antikörperbildung auch bei den Ductuslymphocyten nur den A-Zellen zukommt. Diese Deutung wird noch dadurch gestützt, daß nach einer Ganzkörperbestrahlung der immunisierten Tiere mit 800 R nurmehr etwa 0,02 % der Ductuslymphocyten Antikörper bilden können. In diesem Fall enthalten die Ductuslymphocyten fast keine Zellen des A-Typs mehr. Der allgemeine immunsuppressive Effekt einer Röntgenbestrahlung ist schon lange bekannt (LEONE, 1962; TALIAFERRO et al., 1965).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Versuche von COE et al. (1966), bei denen mittels Ductus-Lymphocyten die Immunität einer Donorratte gegen RGG (rabbis gamma globulin) und HEA (hen egg albumin) auf eine Empfängerratte übertragen wurde. Für eine erfolgreiche Übertragung wurden umso weniger Ductuslymphocyten benötigt, je länger die Drainage des Ductus thoracicus lief. Diese Ergebnisse stimmen gut mit meiner Annahme überein, wonach zu Beginn einer Ductusdrainage zuerst die B-Lymphocyten abgezogen werden, so daß es später dadurch zu einer Anreicherung der A-Lymphocyten kommt, die ja für die Antikörperbildung verantwortlich gemacht werden konnten.

Auch bei einer elektrophoretischen Auftrennung der Milzzellen der Ratte in der analytischen Zellelektrophorese nach HANNIG (1958) fand sich eine Antikörperbildung gegen ein bestimmtes Antigen in der langsam beweglichen Lymphocytenfraktion (RANK, 1967).

Eingehend wurde die Frage geprüft, ob unter den Lymphocyten, die auf ihre Fähigkeit geprüft wurden, Antikörper zu bilden, auch Plasmazellen enthalten waren. Ausstrichpräparate, die nach PAPPENHEIM gefärbt wurden, zeigten aber, daß diese Lymphocytenaufschwemmungen frei von Plasmazellen waren.

Die immunologische Kompetenz der kleinen Lymphocyten ist bekannt (GOWANS et al., 1962; GOWANS u. MCGREGOR, 1965), man macht sie in erster Linie für die Immunreaktion vom verzögerten Typus, dem sog. Tuberkulintypus (delayed hypersensitivity) verantwortlich (DIXON et al., 1957; KOSUNEN et al., 1963). Die humoralen Antikörper werden dagegen hauptsächlich von Plasmazellen gebildet, die jedoch ihren Ursprung in den kleinen Lymphocyten haben dürfen (YOFFEY, 1964); denn NOSSAL (1959) fand zahlreiche Plasma-

zellen in den ersten 24 Stunden nach einer Zweitimmunisierung, konnte jedoch keinerlei Mitosen finden. Die Plasmazellen hatten sich also vermutlich durch Differenzierung aus den kleinen Lymphocyten gebildet.

Auch MEDAWAR (1958) und GOWANS u. McGREGOR (1963) sprechen von 2 Gruppen kleiner Lymphocyten: Immunologisch geprägte (conditioned) und ungeprägte (unconditioned). Die beiden Zellarten sind morphologisch nicht unterscheidbar, die Zellen der ersten Gruppe würden aber durch einen antigenen Reiz so verändert, daß sie sich bei einer zweiten Injektion des gleichen Antigens in Plasmazellen umbilden und mit rascher und spezifischer Antikörperbildung antworten.

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen wurden die humoralen Hämolysin-Antikörper von Lymphocyten gebildet. Mittels der Zellelektrophorese ist es gelungen, die Gruppe der kleinen geprägten Lymphocyten, die für die Antikörperbildung infrage kommen, näher zu charakterisieren. Es handelt sich dabei um A-Lymphocyten, die eine elektrophoretische Beweglichkeit von $0,930 \pm 0,050 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ V}^{-1}]$ aufweisen. Die A-Lymphocyten sind demnach immunologisch-kompetente Lymphocyten im ursprünglichen Sinn von MEDAWAR (1958); die jeweils immungeprägten Zellen nach einem antigenen Reiz stammen aus dieser Zellgruppe. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die kleinen Lymphocyten vom Typ B nicht zur Antikörperbildung befähigt sind. Dabei muß offen gelassen werden, ob es sich bei diesen Zellen um ungeprägte Lymphocyten handelt, oder ob sie für die Antikörperbildung nicht "competent" sind (LENNERT, 1966), sondern andere Funktionen besitzen, z.B. die von Stammzellen.

V. Zusammenfassung

Mit Hilfe einer Zellelektrophoreseapparatur, eines Volumenmeßgerätes, des Plaque-Testes nach JERNE und mittels Markierungsversuche wurden Untersuchungen an Lymphocyten aus Blut, Lymphe und lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark der Ratte durchgeführt.

Ausgangspunkt dieser Experimente war die Beobachtung, daß beim Menschen bei akuten Entzündungen und bei der Ratte nach Röntgenganzkörperbestrahlung und Alkoholinjektion eine zellelektrophoretisch nachweisbar schnelle Leukocytenfraktion auftritt, die im normalen Hämocytopherogramm nicht zu finden ist. Diese Zellen sind morphologisch trotz 800 facher Vergrößerung in der Zellelektrophoreseapparatur nicht sicher zu identifizieren. Nach PAPPENHEIM gefärbte Ausstriche der betroffenen Blute lassen keine neue Zellart erkennen und so stellte sich die Frage, ob diese schnellen Zellen den Lymphocyten oder den Granulocyten zuzurechnen seien.

1. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei diesen schnellen kernhaltigen Zellen, für die eine elektrophoretische Beweglichkeit von $b = 1,090 \pm 0,039 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{v}^{-1}\text{]}$ errechnet wurde, um Lymphocyten handelt.

2. Untersuchungen an splenektomierten Tieren zeigten die entscheidende Rolle der Milz beim Auftreten der schnellen Lymphocyten im Blut: Splenektomierte Tiere haben nach Röntgenganzkörperbestrahlung keine elektrophoretisch schnelle Zellfraktion im Blut und auch die Zellen der Lymphe zeigen Verhältnisse wie bei der unbestrahlten Ratte.

3. Die kleinen Lymphocyten der normalen Rattenlymphe stellen nicht eine einheitliche Population dar, sondern können zellelektrophoretisch in 2 Gruppen unterteilt werden. 23 % der Lymphocyten haben eine elektrophoretische Beweglichkeit von $b = 0,930 \pm 0,050 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{v}^{-1}\text{]}$ (Lymphocyten Typ A) und 77 % haben eine Wanderungsgeschwindigkeit von $1,060 \pm 0,066 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{sec}^{-1}\text{v}^{-1}\text{]}$ (Lymphocyten Typ B). Die A-Lymphocyten re-

präsentieren im normalen Hämocytopherogramm die Fraktion der Lymphocyten, während die B-Lymphocyten den sog. schnellen Zellen des Blutes entsprechen.

4. Die Lymphocyten des Typs B aus der normalen Rattenlymphe werden durch eine in vitro Inkubation mit homologem Ratten-serum nicht in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit verändert.

5. Nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 800 R finden sich bis zu 2 Stunden nach der Bestrahlung in der Lymphhe nur noch Zellen des Typs B; 2-3 Stunden später beginnen sich die Verhältnisse wieder zu normalisieren, es treten wiederum Lymphocyten vom Typ A auf.

6. 92 % der B-Lymphocyten aus der Lymphhe bestrahlter Ratten konnten nach 1-stündiger Inkubation mit H^3 -Adenosin markiert werden. Das zeigt, daß es sich bei diesen Zellen nicht um Abbaustufen handelt, sondern daß sie einen besonders regen Stoffwechsel haben. Normale Blutlymphocyten (Typ A) markierten sich zu 42 % und Lymphocyten aus der Lymphhe normaler Ratten (Typ A und B) zu 50 %.

7. Die kleinen Lymphocyten der normalen Rattenlymphe, die im nach PAPPENHEIM gefärbten Ausstrich nur einen schmalen Cytoplasmasaum aufweisen, konnten auch hinsichtlich ihres Volumens in 2 Populationen unterteilt werden: 79 % der Zellen haben ein Volumen von $142,0 \pm 27,5 \mu^3$ und 21 % von $196,0 \pm 23,9 \mu^3$. Diesen Werten entsprechen Zellaurchmesser von $6,5 \mu$ und $7,2 \mu$, wenn man die Lymphocyten als kugelige Zellen betrachtet.

8. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Population mit dem größeren Volumen den Lymphocyten des Typs A und die mit dem kleineren Volumen denen vom Typ B entspricht.

9. Zellelektrophoretische Untersuchungen an Milz und Lymphknoten von Ratten und Mäusen zeigten, daß in diesen Organen die Lymphocytenfraktionen A und B zu finden sind, wobei bei den Lymphknoten die Streuung zwischen den beiden Gruppen größer ist

als bei der Milz.

10. Das Knochenmark enthält auch Zellen mit einer ähnlichen elektrophoretischen Beweglichkeit wie die der Lymphocyten des Typs B, nur sind diese Zellen bereits im Cytopherometer als morphologisch unterschiedlich zu erkennen; sie sind viel größer und grob granuliert.

11. Zellelektrophoretische Untersuchungen von Thymuszellen der Ratte und der Maus ergaben keine Fraktion mit der Beweglichkeit der Lymphocyten des Typs B, dafür traten Zellen auf, die elektrophoretisch noch langsamer als die Granulocyten waren.

12. Werden markierte Blut- oder Ductus-Lymphocyten ins Blut einer anderen Ratte transfundiert, so findet man 24 Stunden später im Empfängertier markierte Zellen im Blut, in der Lymphe, in der Milz und in den Lymphknoten. Keine markierten Zellen findet man jedoch im Thymus und im Knochenmark.

13. Die peripheren Blutbilder von Ratten zeigten, daß es nach Alkoholinjektion, genau wie nach einer Röntgenganzkörperbestrahlung, zu einem ausgeprägten Lymphocytensturz kommt. Während des steilsten Abfalls der Lymphocytenwerte treten schnelle Zellen im Hämocytogramm auf.

14. Die Lymphocytenwerte des peripheren Blutes von Ratten, denen der Ductus thoracicus unterbunden worden war, fallen innerhalb von 3 Stunden auf 39 % ihres Ausgangswertes ab. Die scheinoperierten Kontrolltiere zeigen einen Fall bis auf 49 % ihres Ausgangswertes.

15. Die Lymphocyten des Typs A, die sich im Blut und zu 20 % in der Rattenlymphe finden, kommen für die Bildung zellständiger Antikörper einer Ratte gegen Schafererythrocyten infrage.

VI. Literaturverzeichnis

- ALBERT, S., P.L.WOLF u.R.POTTER (1966): Observations on the origin of lymphocyte-like cells in mouse bone marrow. *Nature*, 212, 1577-1579.
- ARNOLD, R. (1964): Die elektrophoretische Beweglichkeit von Blutzellen bei Ratten und Mäusen. Dissertationsschrift Universität München
- BARNES, B.A., G.L.BROWNELL, M.H.FLAX (1964): Irradiation of the blood: Method of reducing lymphocytes in blood and spleen. *Science* 145, 1188.
- BASERGA, A. et A.MORSIANI (1961): La régénération lymphocytaire après predrisone. *Schweiz.Med.Wschr.* 9, 1190.
- BOLIMANN, J.L., J.C. CAIN u.J.H.GRINDLAY (1948). *J.Lab.Clin.Med.* 33, 1349.
- CAFFREY, R.W., W.O.RIPKE u.N.B.EVERETT (1962): Radioautographic studies of small lymphocytes in the thoracic duct of the rat. *Acta Haematol.* 28, 145.
- COE, J.E., J.D.FELDMANN u.SUN LEE (1966): Immunologic competence of thoracic duct cells. *J.exp.Med.* 123, 267-281.
- COULTER, W.H. (1956): High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. *Proc.Nat.Elec.Conf.* 12
- CRONKITE, E.P., V.P.BOND, T.M.FLIEDNER u.J.R.RUBINI (1959): The use of tritiated thymidine in the study of DNA synthesis and cell turnover in hemopoietic tissues. *Lab.Invest.* 8, 263-277.
- CRONKITE, E.P. (1960): In Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis. London: Churchill
- CRONKITE, E.P., C.R.JANSEN, G.C.MATHER, N.O.NIELSEN, E.A.USENIK, E.R.ADAMIK, C.R.SIPE (1962): Studies on lymphocytes. I. *Blood* 20, 203.
- DELORME, E.J. (1961) : Recovery from lethal irradiation in rats after intravenous administration of isogenic lymphocytes. *Lancet* 2, 855-857.

- DIXON, F.J. W.C.WEIGH u.J.C.ROBERTS (1957): Comparison of antibody response associated with transfer of rabbit lymph node, peritoneal exudate and thymus cells. J.Immunol.78, 56.
- DOUGHERTY, T.F. u.J.A.FRANK (1953): The quantitative and qualitative responses of blood lymphocytes to stress stimuli. L.Laborat. 42, 530
- EVERETT, N.B., W.O. REINHARDT, J.M.YOFFEY u.L.MATSON (1959): Unpublished data cited by YOFFEY (1960): In Quantitative Cellular Haematology. CHARLES V.THOMAS, Springfield, III.
- FEESER, C. (1966): Versuche zur Isolierung einer hämatopoetisch wirksamen Substanz aus der Milz. Dissertationsschrift, Universität München.
- FLIEDNER, T.M., V.KRETSCHMER, M.HILLEN u.F.WENDT (1965): DNS- und RNS-Synthese in mit Phytohämagglutinin stimulierten Lymphocyten. Schweiz.Med.Wschr. Nr.44 Bd.95, 1499.
- GIDALI, J. u.I.FEHER (1964): Some data on mechanism of leukopenia and leukocytosis following irradiation. Blodd 23, 27.
- GOOD, R.A., M.D. COOPER, R.D.A.PETERSON, M.A.SOUTH (1966): The functions of the thymus and the bursa system in the chicken. Blut 13, 383.
- GOSTOMZYK, J.G., R.ARNOLD, G.RUHENSTROTH-BAUER (1963): Zur Frage der Beziehung zwischen Milz und Knochenmark nach einer Ganzkörperbestrahlung. Naturwissensch.50, 704.
- GOSTOMZYK, J.G., C.LÜCKE-HUHLE, P.HEIDENREICH G.RUHENSTROTH-BAUER (1965): Die Wirkung einer Milzfraktion auf die Überlebensrate röntgenbestrahlter Tiere und auf die Mitoseaktivität von Milz- und Knochenmarksgewebe in vitro. Proc.10th Congr.europ.Soc.Haemat.2, 463-468.
- GOWANS, J.L.(1959): The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. J.Physiol.146, 54-69.
- GOWANS, J.L., B.M.GESNER u.D.D.McGREGOR (1961): In: Biological activity of the leucocyte. Ciba Foundation Study Group no 10.London:Churchill

- GOWANS, J.L., D.D.McGREGOR, D.M.COWEN u.C.E.FORD (1962):
Initiation of immune responses by small lymphocytes.
Nature 196, 651-655.
- GOWANS, J.L. u.D.D.McGREGOR (1965): The immunological activity
of lymphocytes. Progr.Allergy 9, 1.
- GOWANS, J.L. u.E.J.KNIGHT (1964): The route of recirculation
of lymphocytes in the rat. Proc. Roy.Soc. B.159, 257-282.
- GRAF-HENNING (1953): Formeln und Tabellen der matheamtischen
Statistik. Springer Verlag, Berlin.
- GRUNDMANN, E. (1958): Die Bildung der Lymphocyten und Plasmazel-
len im lymphatischen Gewebe der Ratte. Beitr.Path.Anat.
und Allg.Pathol.119, 217-262.
- GUTMANN, J. (1966 a): Ein eichbares Gerät zur Bestimmung der sta-
tistischen Verteilung der Zellvolumina einer Population.
Elektromed. Nr.2, Bd.11, 80.
- GUTMANN, J. (1966 b): Elektronische Verfahren zur Ermittlung sta-
tistischer Maßzahlen einiger medizinisch wichtiger Daten.
Elektromed. Nr.2, Bd.11, S.62.
- HAGEN, U. (1962): Strahlenschädigung der lymphatischen Organe.
Med.Welt 18, 1009.
- HANNIG, K. (1958): Eine Apparatur zur kontinuierlichen Ablenkungs-
elektrophorese auf Filtrierkarton bei gleichzeitiger An-
wendung hoher Feldstärken. Hoppe-Syler's Z.physiol.Chem.311, 63.
- HARRIES, H. (1959): Turnover of nuclear and cytoplasmic ribonucleic
acid into types of animal cells, with some further obser-
vations on the nucleolus. Biochem.J.73, 362.
- HITZIG, W.H. (1966): Lymphocyten und Proteine. Acta hämat.36, 50-62.
- JERNE, N.K., A.A.NORDIN (1963): Plaque formation in agar by single
antibody-producing cells. Sc.140, 405.
- KOSUNEN, P.U., B.H.WAKSMAN, M.H.FLAX u.W.S.THEN (1963): Delayed
reactions to tuberculin and purified proteins in the rat
and guinea-pig. Immunol.6, 276.

- LENNERT, K. (1966): Bildung und Differenzierung der Blutzellen, insbesondere der Lymphocyten. Verhandl. Dtsch. Gesellschaft f. Path., Heidelberg, G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- LEONE, C.E. (1962): Effects of ionizing radiation on immune processes. Gordon and Breach, New York.
- LITTLE, J.R., G.BRECHER, T.R. BRADLEY u.S. ROSE (1962): Determination of lymphocyte turnover by continuous infusion of H^3 -thymidine. Blood 19, 236.
- MARCHESI, V.T. u. J.L. GOWANS (1964): The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. Proc. Roy. Soc. B 159, 283-290.
- MCGREGOR, D.D. u. J.L. GOWANS (1963): The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct. J. Exp. Med. 117, 303-320.
- MEDAWAR, P.B. (1958): zitiert bei MEDAWAR (1963). The immunological competent cell. Ed. G.E.W. Wolstenholme u. J. KNIGHT p. 1-5 London, J. u. A. Churchill LTD 1963.
- MICHAELIS, L. (1931): Biochem. Taschenbuch. RAUEN: Springer Verlag 1956.
- NISIMARU, Y. (1965): Blood and lymph vessels and body fluid flow in the spleen. Hiroshima Journal Med. Sc. 14, 101-124.
- NOSSAL, G.J.V. (1959): Antibody production by single cells. III. The histology of antibody production. Brit. J. exp. Pathol. 40, 301-311.
- OULIE, (1958): Nord. Med.
- PONDER, F. (1951): Effects produced by trypsin on certain properties of the human red cell. Blood 6, 350.
- RANK, W.R. (1967): Dissertationsschrift: in Vorbereitung.
- REINHARDT, W.O. (1964): Some factors influencing the thoracic duct output of lymphocytes. Ann. N. J. Acad. Sc. 113, 844.
- ROMEIS, B. (1948): Mikroskopische Technik. R. Oldenburg, München.

